

**DANIELE KAZUE SUGIOKA**

**CARACTERIZAÇÃO DO REPERTÓRIO DE HAPLÓTIPOS *KIR* E LIGANTES  
*HLA-Cw* EM FAMÍLIAS E PACIENTES COM DOENÇAS HEMATOPOIÉTICAS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria da Graça Bicalho

**CURITIBA**

**2009**

**DANIELE KAZUE SUGIOKA**

**CARACTERIZAÇÃO DO REPERTÓRIO DE HAPLÓTIPOS *KIR* E LIGANTES  
*HLA-Cw* EM FAMÍLIAS E PACIENTES COM DOENÇAS HEMATOPOIÉTICAS.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho

**CURITIBA**

**2009**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **DANIELE KAZUE SUGIOKA** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito **"B"**.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 24 de abril de 2009

Professora Doutora Maria da Graça Bicalho  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Professora Doutora Ida Cristina Gubert - Depto. de Patologia Básica, UFPR  
Membro Titular

Professora Doutora Lupe Furtado Alle - UFPR  
Membro Titular

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

## **AGRADECIMENTOS**

O agradecimento principal que excede a qualquer sentimento palpável é a DEUS. A essência de toda força, capacitação e amor.

Aos meus PAIS, IZABEL SUGIOKA E KAZUMI SUGIOKA, por todo amor, fé, paciência e dedicação a minha vida. Acrescentando dia a dia, sem ao menos um dia de decréscimo, ao meu coração, sabedoria, honestidade e muito amor, mesmo distantes de mim. Todo meu caráter foi edificado e consolidado por ambos.

As minhas irmãs, DEYSE MITIE SUGIOKA e DENIZE YUKIE SUGIOKA, por todas as palavras de incentivo, e demonstrações constantes de carinho e preocupação.

Ao Marcio Roniak, por toda força e incentivo dedicados a mim. E, principalmente, por todo amor, demonstrado em atitudes práticas de esforço e de um novo viver.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho, pelo exemplo de caráter, humanidade, simplicidade e, obviamente por todo o apoio, incentivo e perseverança, por acreditar no meu trabalho e dedicar seu tempo em ensinamentos.

Agradecer, ao meu querido Prof<sup>o</sup>. JUAREZ GABARDO, por todo amor e tempo dedicados a me incentivar em todos os sentidos. Agradecer pelas longas conversas, abraços tão ansiados por mim em recebê-los, algumas vezes em lágrimas e outras em sorrisos.

Agradecer, de todo coração, ao MARCIO MARQUES DE MORAES. Uma pessoa pela qual tenho enorme carinho e profunda admiração. Agradecer somente em palavras, talvez seja muito pouco por todo esforço e tempo dedicados ao projeto e em me auxiliar. Simplesmente não tenho mais palavras que possam expressar tamanha gratidão e apreço que tenho.

Ao Rafael Vargas, pelo incentivo e auxílio dados durante todo o processo de desenvolvimento do projeto.

A toda equipe LIGH, por todo carinho e ensinamentos transmitidos sejam eles técnicos ou de experiência de vida: Alessandro, Anna, Bia, Cláudia, Clineu, Eni, Fernanda, Gorete, Isabel, José Luis, Marina, Patrícia, Paulo, Rafael, Samuel, Sibelle, Sonia, Suellen, Téo e aos demais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Professora Lupe Furtado, um exemplo que tenho de paixão à ciência e ao ensino, uma mistura de seriedade e alegria. .Agradecer por todas as palavras ditas de carinho e força.

À todos os Professores do Departamento de Genética, por compartilhar de sua sabedoria e por semear a ética e a consciência científica. Um agradecimento especial às Prof.<sup>a</sup> Ida Cristina Gubert e a Noemi Farah, pelas sugestões e críticas durante a realização do presente trabalho.

Ao Dr. Eduardo Cilião e ao Dr Jonny Camargo, juntamente com sua equipe do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba por toda colaboração e pela disponibilização de amostras e dados referentes aos pacientes.

Obrigado à TODOS que fazem parte dessa minha família!

“...sabendo que a tribulação produz a  
paciência. E a paciência a experiência, e a  
experiência a esperança...”  
Rm 5:3-5

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xv</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas.....	3
2.2. O MHC Humano.....	9
2.3. Células <i>Natural Killer</i> .....	12
2.3.1. Hipótese do “ <i>Missing-Self</i> ” (Perda do Próprio) .....	13
2.3.2. Diferentes Estruturas de Reconhecimento das Células <i>Natural Killer</i> .....	17
2.3.2.1. Receptores de células <i>NK</i> que reconhecem ligantes não MHC .....	17
2.3.2.2. Receptores de células <i>NK</i> que reconhecem ligantes relacionados ao MHC .....	18
2.3.2.3. Receptores de células <i>NK</i> que reconhecem ligantes MHC de classe I .....	19
2.4. <i>LCR (Leukocyte Receptor Complex)</i> .....	23
2.5. Genes <i>KIR</i> .....	25
2.6. Nomenclatura dos Genes <i>KIR</i> .....	28
2.7. Nomenclatura de Haplótipos <i>KIR</i> .....	30
2.8. Estrutura Gênica e Variabilidade Alélica.....	32
2.9. Organização Gênica.....	34
2.10. Proteína <i>KIR</i> .....	39
2.10.1. Interações entre receptores <i>KIR</i> e seus Ligantes <i>HLA-Cw</i> .....	41
2.11. Controle de Expressão.....	43
2.12. Genes <i>KIR</i> e Transplante.....	44
2.13. Frequências <i>KIR</i> .....	46
2.14. Haplótipos <i>KIR</i> .....	52
2.15. Ligantes <i>KIR</i> .....	58
2.16. Interações <i>KIR</i> -HLA.....	60

2.17. <i>KIR</i> -ligante.....	64
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>67</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>68</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
5.1. Caracterização da Amostra.....	70
5.2. Extração do Dna Genômico .....	70
5.3. Concentração do DNA .....	70
5.4. Tipagem dos Genes <i>KIR</i> e locos HLA-Cw pela Técnica PCR-SSOP .....	71
5.6. Análise Estatística .....	75
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
6.1. Características Gerais da Amostra.....	77
6.1.1. Estrutura e composição do núcleo familiar.....	77
6.1.2. Grupo racial, sexo, idade e doença de base do paciente.....	78
6.1.3. Doença de base do paciente <i>versus</i> número de irmãos.....	82
6.2. Frequência da presença/ausência dos genes <i>KIR</i> nos pacientes.....	88
6.2.1. Genótipos e Haplótipos <i>KIR</i> dos pacientes.....	92
6.3. Frequência da presença/ausência dos genes <i>KIR</i> nas irmandades.....	94
6.3.1. Genótipos e Haplótipos <i>KIR</i> das irmandades.....	97
6.4. Frequência da presença/ausência dos genes <i>KIR</i> nos pais dos pacientes (N=50).....	100
6.4.1. Genótipos e Haplótipos <i>KIR</i> dos pais.....	102
6.5. Comparação de frequência de Haplótipos de pacientes, irmandades e pais.....	104
6.6. Interações <i>KIR</i> ligantes no subgrupo de pacientes com LMA.....	106
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>111</b>
7.1. Características gerais da amostra.....	111
7.2. Frequência da presença/ausência dos genes <i>KIR</i> nos pacientes.....	118
7.3. Genótipos e haplótipos.....	128
7.4. Modelo Incompatibilidade <i>KIR</i> -Ligante.....	137
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>147</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>182</b>



ANEXO I – TABELA DE SINÔNIMOS DOS LOCOS <i>KIR</i> .....	182
ANEXO II – PROTOCOLOS DE TÉCNICAS.....	184

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Localização e estrutura do MHC humano .....	10
FIGURA 2 – Estrutura das moléculas HLA de classe I e de classe II .....	11
FIGURA 3 – Hipótese do “ <i>Missing-Self</i> ” revisada .....	14
FIGURA 4 – Receptores das células <i>NK</i> com ligantes MHC I .....	22
FIGURA 5 – Região Cromossômica do <i>LRC</i> e dos <i>KIR</i> .....	23
FIGURA 6 – Organização Genômica do conjunto de genes <i>KIR</i> .....	27
FIGURA 7 – Nomenclatura dos genes <i>KIR</i> .....	29
FIGURA 8 – Representação dos Haplótipos A e B .....	35
FIGURA 9 – Seqüência dos genes <i>KIR</i> em Haplótipos.....	36
FIGURA 10 – Diversidade haplotípica do grupo B .....	37
FIGURA 11 – Variações alélicas dos Haplótipos <i>KIR</i> .....	38
FIGURA 12 – Características estruturais dos receptores <i>KIR das Celulas NK</i> .....	40
FIGURA 13 – <i>KIR</i> mediando ativação/inibição de células <i>NK</i> em doenças.....	49
FIGURA 14 – Especificidade <i>KIR</i> -ligante HLA.....	58
FIGURA 15 – Modelo de hierarquia de inibição.....	61
FIGURA 16a – Princípios da técnica PCR-SSOP para tipagem <i>KIR</i> .....	72
FIGURA 16b – Princípios da técnica PCR-SSOP para tipagem <i>KIR</i> (continuação).....	73
GRÁFICO 1 – Distribuição da estrutura familiar dos pacientes.....	77
GRÁFICO 2 – Frequência de pacientes de acordo com seu grupo racial.....	78
GRÁFICO 3 – Doenças de base e grupos raciais.....	79
GRÁFICO 4 –Distribuição dos pacientes (N=39) de acordo com o sexo.....	80
GRÁFICO 5– Representação dos pacientes (N=39) em relação ao sexo e doença de base.....	81
GRÁFICO 6 – Média de irmãos por grupo de pacientes com doença de bases distintas (N=136).....	83

GRÁFICO 7. Frequencia das irmandades de acordo com seu grupo racial (N=136).....	84
GRÁFICO 8. Doença de base dos pacientes e grupo racial das irmandades (N=136).....	84
GRÁFICO 9. Distribuição das irmandades (136) de acordo com o sexo.....	86
GRÁFICO 10. Representação das irmandades (N=136) em relação ao sexo e doença de base.....	87
GRÁFICO 11. Número de indivíduo que apresentam os diferentes genótipos <i>KIR</i> na amostra pacientes, irmandades e pais.....	104
GRÁFICO 12. Distribuição da frequência haplotípica de pacientes, irmandades e pais.....	105
GRÁFICO 13. Distribuição das frequências dos haplótipos A e B entre pacientes (N=39) e controles normais (N=136).....	106

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de transplantes realizados no Brasil (1995-2003).....	4
TABELA 2 – Características das moléculas HLA de classe I e II .....	10
TABELA 3 – Receptores <i>KIR</i> e seus ligantes <i>HLA-Cw</i> .....	41
TABELA 4 – Conversão sorológica das tipagens moleculares de <i>HLA-Cw</i> .....	42
TABELA 5 – Características funcionais e estruturais dos receptores <i>KIR</i> .....	42
TABELA 6 – Condições de amplificação para realização da PCR-SSOP para tipagem dos genes <i>KIR</i> .....	74
TABELA 7 – Características gerais dos pacientes.....	82
TABELA 8 – Características gerais das irmandades.....	88
TABELA 9 – Distribuição das freqüências dos genes <i>KIR</i> nos pacientes (N=39).....	89
TABELA 10 – Freqüência de cada gene <i>KIR</i> dos pacientes (N=39) e população normal (N=136).....	90
TABELA 11 – Freqüência de cada gene <i>KIR</i> de pacientes LLA (N=12) e LMA (N=11).....	91
TABELA 12 – Genótipos e Haplótipos <i>KIR</i> observados nos pacientes.....	93
TABELA 13 – Distribuição das freqüências dos genes <i>KIR</i> nas irmandades (N=136).....	95
TABELA 14 – Freqüência de cada gene <i>KIR</i> das irmandades (N=136) e população normal (N=136).....	96
TABELA 15 – Genótipos e Haplótipos <i>KIR</i> das irmandades.....	99
TABELA 16 – Distribuição das freqüências dos genes <i>KIR</i> nos pais (N=50) dos pacientes .....	100
TABELA 17 – Freqüência de cada gene <i>KIR</i> dos pais (N=50) e população normal (N=136).....	101
TABELA 18 – Genótipos e haplótipos <i>KIR</i> dos pais.....	103
TABELA 19. Comparação da distribuição dos haplótipos A e B entre pacientes (N=39) e controles normais (N=136).....	105
TABELA 20 – Famílias com LMA.....	107
TABELA 20 – Famílias com LMA (continuação).....	108
TABELA 21– Modelo incompatibilidade <i>KIR</i> -ligante-Protocolo HLA.....	109
TABELA 22– Modelo incompatibilidade <i>KIR</i> -ligante-Protocolo <i>KIR</i> .....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS

Células <i>NK</i>	- Células <i>Natural Killer</i> ;
<i>KIR</i>	- <i>Killer-cell Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Imunoglobulina das Células <i>Natural Killer</i> ;
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> ou Complexo Principal de Histocompatibilidade;
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i> ou Antígeno Leucocitário Humano;
SNT	- Sistema Nacional de Transplantes;
GvHD	- <i>Graft-versus-Host Disease</i> ou Doença de Enxerto Contra Hospedeiro;
TMO	- Transplante de Medula Óssea;
GVL	- <i>Graft-versus-Leukemia Effect</i> ou Efeito Enxerto <i>versus</i> Leucemia
EBMT	- European Group for Blood and Marrow Transplantation ou Grupo Europeu Transplante de Medula Óssea;
TCPH	- Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas
DVMO	- Doadores Voluntários de Medula Óssea
REDOME	- Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
LIGH	- Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade
REREME	- Registro Brasileiro de Receptores de Medula Óssea
TCR	- <i>T cell Receptor</i> ou Receptor das Células T;
APC ou CAA	- <i>Antigen-presenting Cells</i> ou Células Apresentadoras de Antígenos;
Ig	- Imunoglobulina
LILR	- <i>Leukocyte Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Ig Leucocitários;
LRC	- <i>Leukocyte Receptor Complex</i> ou Complexo de Receptores Leucocitários;
ITIM	- Imunoreceptor com Motivo Inibidor baseado em Tirosina;
ITAM	- Imunoreceptor com Motivo Ativador baseado em Tirosina;
KARAP	- <i>Killer Cell Activating Receptor Associated Protein</i> ou Proteína Associada ao Receptor Ativador de Células NK;
ILT	- <i>Ig-like transcripts</i> ou Transcritos semelhantes à Ig
LENG	- <i>LRC Encoded Novel Gene</i> ou Novo gene LRC
NKC	- <i>Natural Killer Complex</i> ou Complexo <i>Natural Killer</i> ;
HUGO	- <i>Human Genome Organization</i>
LNH	- Linfoma Não Hodgkin Folicular
LLA	- Leucemia Linfóide Aguda
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
LMC	- Leucemia Mielóide Crônica
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase;

- SSP                    - *Single Sequence Primer* ou Iniciador de Seqüência Específica;
- SSOP                - *Sequence Specific Oligonucleotide Probe* ou Sonda  
Oligonucleotídica de Seqüência Específica;

## RESUMO

Desde a descoberta do sistema de histocompatibilidade a literatura específica tem relacionado genes envolvidos com a resposta imune, como os do sistema *HLA* para um melhor prognóstico do transplante. Contudo, outros genes não *HLA* podem estar também influenciando, como por exemplo, os genes codificantes de receptores semelhantes à Imunoglobulina das células *Natural Killer* (*KIR*). A descoberta que receptores semelhantes à Ig (*KIR*) das células *NK* interagem com epítomos geneticamente polimórficos em moléculas *HLA* classe I, e que o repertório próprio de receptores *KIR* é geneticamente variável, levou à investigação da relevância do sistema *KIR* para transplante de células progenitoras hematopoiéticas. A cura dos pacientes com leucemias e outras doenças malignas hematológicas após o Transplante de Medula Óssea (TMO) alogênico tem sido atribuída, em parte, à capacidade das células imunes do doador, presentes no enxerto, reconhecerem e eliminarem as células neoplásicas do paciente. A ação citotóxica das células *NK* é mediada por interações entre receptores de superfície celular e moléculas *HLA* de classe I específicas na superfície da célula alvo. A ausência de ligantes *HLA* I específicos na superfície da célula alvo para receptores *KIR* inibidores pode levar a aloreatividade das células *NK* do receptor contra células do aloenxerto (hipótese “missing-self”). Esta ausência do ligante específico é denominada em vários estudos como “Incompatibilidade *KIR*-Ligante”. No presente estudo foi analisada, através da técnica de tipagem PCR-SSOP, a presença/ausência de 16 genes *KIR*, os genótipos e haplótipos *KIR* de 39 famílias de pacientes com doenças hematopoiéticas e, uma comparação foi realizada com dados de uma amostra da população paranaense. Foi realizada também a tipagem do locus *HLA-Cw*, conhecido por ser um dos ligantes específicos de *KIR*, e, com base no genótipo *KIR* de potenciais doadores no núcleo familiar e genótipos *HLA-Cw* do paciente desenvolveu-se um modelo teórico com o grupo de 11 pacientes LMA para escolha de duplas doador/receptor baseando-se na incompatibilidade *KIR*-ligante. Neste estudo foi desenvolvido também um modelo de banco de dados que descreve as características gerais, como grupo racial, sexo, idade e doença de base. As frequências da presença/ausência dos genes *KIR* foram semelhantes às frequências observadas em populações européias, o que seria de se esperar considerando-se a predominância de Brancos euro-descendentes na região Sul do Brasil. Os genes de moldura *KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2* foram positivos em todas as amostras. A comparação do repertório *KIR* entre pacientes, irmandades e pais de pacientes com indivíduos controles normais pertencentes ao banco de dados do LIGH, revelou na amostra paciente que os genes inibidores *KIR2DL2* (**p=0,0005**) e *KIR2DL5* (**p=0,0067**), bem como os genes ativadores *KIR2DS1* (**p=0,0013**), *KIR2DS2* (**p=0,0038**), *KIR2DS3* (**p=0,0153**) apresentaram diferenças significativas (**p<0,05**). No presente estudo, observamos uma maior frequência de haplótipos A nos grupos analisados. Entre os 39 pacientes observamos 59% haplótipos A vs 41% haplótipos B; na irmandade 62% vs 38% e entre os pais, 57% vs 43%. No que se refere à distribuição e comparações de genótipos entre pacientes e controles, observamos que os homozigotos AA (**p=0,0463**) e heterozigotos AB (**p=0,0282**) apresentaram diferenças significativas. Tais achados merecem ser interpretados com ampliação do tamanho amostral em novos estudos investigativos.

## 1. INTRODUÇÃO

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas derivadas da medula óssea ou sangue periférico tem sido usado como um procedimento terapêutico desde a primeira metade dos anos 70 (HOLOWIECKI, 2008).

A cura de pacientes com leucemias e outras doenças malignas hematológicas após o Transplante de Medula Óssea (TMO) alogênico tem sido atribuída, em parte, à capacidade das células imunes do doador, presentes no enxerto, reconhecerem e eliminarem células neoplásicas do paciente. O termo TMO, vem sendo modificado por um termo mais específico: Transplante de Células Progenitoras Hematopoéticas (TCPH), que reflete melhor o tipo de procedimento realizado e o tipo de célula que o paciente irá receber para reconstituir sua medula óssea.

O aumento da atividade das células *Natural Killer* (NK) após o transplante, mesmo com o receptor e doador sendo HLA idênticos, sugere que a citotoxicidade destas células do receptor contra o doador possa ser um componente adicional previamente não reconhecido do processo de rejeição.

As células NK são derivadas da medula óssea e possuem importantes funções na regulação da resposta imune inata. Entretanto, baseado em sua linhagem de origem, repertório de receptores e funções efetoras, acredita-se que as células NK sejam um tipo celular transicional, que seria uma “ponte” entre o sistema imune inato e adaptativo (LANIER, 2005). Células NK participam da imunovigilância lisando células tumorais, células infectadas por vírus e sob estresse, através da liberação de citocinas e da atividade citolítica. (TRINCHERI, 1989; BRUTKIEWICZ & WELSH, 1995; DOKUN *et al.*, 2001; LONG, 2002; MORETTA *et al.*, 2002; FRENCH & YOKOYAMA, 2003), além de participar da rejeição em transplantes, como o de medula óssea em modelos experimentais murinos (BIX *et al.*, 1991).

A atividade citolítica das células NK humanas é regulada pela interação de receptores de membrana ativadores e inibidores, expressos por estas células, com moléculas de superfície presentes em células alvo, como por exemplo, as moléculas HLA (Antígenos Leucocitários Humanos, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) de classe I (MIDDLETON *et al.*, 2005). As células NK podem ser ativadas pela ausência das próprias moléculas HLA em outras células NK (KARRE, 2002; KARRE *et al.*, 1986; LANIER, 1998; MORETTA e MORETTA, 2004).



As células *NK* aloreativas possuem uma influência importante no resultado de TCTH. Em TCTH *HLA*-incompatível, a aloreatividade ocorre quando células *NK* do doador licenciadas expressando Receptores Semelhantes à Imunoglobulina das Células *Natural Killer* (*KIR* do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*) inibidores para ligantes MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe I do doador, reconhecem a falta de ligantes MHC de classe I no receptor incompatível, a denominada Hipótese do "Missing self" (YU et al., 2009). A hipótese do "missing-self" postula que as células *NK* reconhecem e eliminam células que não expressam moléculas próprias do MHC (MIDDLETON et al., 2005).

Diversos estudos da associação com doença indicam um papel para interações entre estes locos *KIR* e *HLA* e doenças infecciosas, doenças autoimunes/inflamatórias, câncer e reprodução (KULKARNI et al., 2008).

Tem-se observado que células leucêmicas de pacientes com Leucemia Mielóide, particularmente em sua forma aguda, são consideravelmente mais susceptíveis ao ataque das células *NK* (JACOB et al., 2007). Também tem sido observado que a frequência de genes *KIR* ativadores em grupos de pacientes com LMA (Leucemia Mielóide Aguda) com risco padrão é mais alta quando comparada com pacientes de alto risco (ZHAO et al., 2008).

Dentre as três famílias de receptores de células *NK* conhecidas cujos ligantes são as moléculas MHC de Classe I, tais como ILTs, receptores tipo lectina C e *KIR*, optou-se no presente estudo por investigar o repertório *KIR* em familiares - pais, mães e irmãos- e pacientes com doenças hematopoéticas.

## 2. REVISÃO BILIOGRÁFICA

### 2.1. Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas derivadas da medula óssea ou sangue periférico tem sido usado como um procedimento terapêutico desde a primeira metade dos anos 70. Diferentemente da maioria dos transplantes, é uma terapia celular em que o tecido transplantado não é vascularizado nem sólido, como é caso do transplante de fígado ou rim, por exemplo, mas células do sistema imune do doador que são transferidas para o receptor (HOLOWIECKI, 2008).

Neste procedimento, o paciente (receptor) recebe a medula óssea por meio de uma transfusão, ou seja, as células mãe ou progenitoras do sangue são colhidas do doador, colocadas em uma bolsa de “sangue” e transfundidas para o paciente. As células transfundidas circulam pelo sangue, instalam-se no interior dos ossos, dentro da medula óssea do paciente. Depois de um período variável de tempo ocorre a "pega" da medula, quando as células do doador começam a se multiplicar, produzindo as células sangüíneas e enviando ao sangue: glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas normalmente. O tratamento tem como objetivo a substituição da medula óssea não funcional, ou deficitária, por células normais de medula óssea de um doador sadio, buscando regenerar a medula do paciente. (informações disponíveis no *site* do AMEO: Associação da Medula Óssea, <http://www.ameo.org.br/interna2.php?id=5> Acesso em: Janeiro de 2009).

Segundo estatísticas disponíveis no *site* do Sistema Nacional de Transplantes foram realizadas no país 50751 transplantes de órgãos (abrangendo transplantes de coração, pâncreas, pulmão, fígado, córnea, rim entre outros) no período de 1995 a 2003, de doadores vivos ou cadavéricos (TABELA 1). No mesmo período, foram realizados 4813 transplantes de medula óssea no Brasil. Informações disponíveis no *site* do Sistema Nacional de Transplantes (<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/integram.htm> Acesso em: Abril 2009).

TABELA 1. NÚMERO DE TRANSPLANTES REALIZADOS NO BRASIL (1995-2003)

**TRANSPLANTES REALIZADOS POR ANO\***

1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	TOTAL
4134	3979	3932	4299	5128	6299	7229	7981	7770	<b>50751</b>

**TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA POR ANO**

1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	TOTAL
242	267	354	373	494	568	705	871	939	<b>4813</b>

**Tabela 1.** Número de transplantes realizados no Brasil no período entre os anos de 1995 e 2003. \* Dados calculados a partir de transplantes de coração, rim, córnea, medula óssea, fígado, pulmão e pâncreas. Durante este período foi registrado um acréscimo no número de transplantes da ordem de 97,6%, enquanto que o acréscimo de transplantes de medula óssea foi de 165,3% no mesmo período. Dados obtidos do site do Sistema Nacional de Transplantes. (<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/integram.htm>, acesso em Abril de 2009).

Existem três tipos de transplantes:

**Autólogo:** Neste tipo de transplante o paciente é seu próprio doador. Esse procedimento é indicado somente para algumas doenças. Após o paciente completar as sessões de quimioterapia, as células progenitoras da medula óssea são retiradas do próprio paciente, armazenadas e transfundidas após altas doses de quimioterapia (condicionamento) a fim de eliminar células doentes e reconstituir a medula óssea;

**Singênico:** é o transplante de medula óssea entre irmãos gêmeos idênticos; neste caso, o paciente certamente tem um doador compatível que possui características genéticas idênticas a ele;

**Alogênico:** as células-tronco ou células progenitoras do sangue são recebidas de outra pessoa, um provável doador selecionado por testes de compatibilidade HLA. Esse doador compatível pode ser um irmão, irmã, parentes próximos ou pode ser um doador voluntário não aparentado, cadastrado em bancos de medula óssea ou em bancos de cordão umbilical.

A complicação mais freqüente do transplante de medula óssea está associada a problemas de incompatibilidade, denominada Doença de Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) ou GvHD (*Graft-versus-Host Disease* do inglês), popularmente conhecida como "rejeição", na qual as células do doador transplantadas reconhecem as células do organismo do paciente como "estranhas" e desencadeiam uma resposta imunológica contra o organismo do paciente (HOLOWIECKI, 2008). A rejeição atinge principalmente: pele, trato gastrointestinal e fígado. Após o TCPH, a nova medula óssea produz linfócitos que reconhecem o organismo do paciente como estranho o que acarreta uma resposta imune que destrói e agride as células de alguns tecidos e órgãos do paciente. A ocorrência da rejeição em suas formas leves e limitadas também é importante para a prevenção da recaída da doença. Em algumas situações tem sido observado um efeito protetor deste reconhecimento imune por parte de células do doador por agredir células leucêmicas do paciente, levando a uma menor chance de recaída. Essa resposta é denominada efeito Enxerto X Leucemia (*Graft-versus-Leukemia Effect- GVL* no inglês).

O número de transplantes relatado no registro de Transplante de Medula e Sangue do grupo Europeu (EBMT) para o ano de 2007 foi de aproximadamente 23500, sendo 9012 (38%) dos procedimentos alogênicos e 14524 (62%) autólogos (HOLOWIECKI, 2008). Promover avanços exige aumento de financiamento e uma melhora do sistema de saúde pública como um todo. Para recomendar um transplante é necessário comparar o risco associado com a doença *versus* o procedimento do transplante que, depende do estágio da doença, da idade do paciente, do tempo de intervalo para o diagnóstico do transplante, do tipo do doador (irmãos ou doadores não relacionados), sexo do doador e características individuais. (HOLOWIECKI, 2008).

O TCPH é uma das alternativas mais eficientes no processo de tratamento de determinadas doenças do sistema hematopoiético. Atualmente, o TCPH tem sido indicado como tratamento para o mieloma, linfoma maligno e leucemia mielóide aguda, e para finalidades experimentais, em doenças auto-imunes (HOLOWIECKI, 2008).

Tanto o transplante autólogo quanto o transplante alogênico fazem parte de um processo de tratamento para leucemias, linfomas e certas doenças menos comuns. Conseqüentemente, as indicações para TCPH sofrem mudanças, resultado de todos os avanços na prática médica. Os fatores de particular significância envolvem benefícios reconhecidos em situações específicas de transplante, melhor suporte no tratamento (drogas anti- infecciosas, preparações do sangue, condições de tratamento e a introdução de medicamentos alternativos na terapia de algumas doenças).

Diversos ensaios clínicos e experimentos têm sido executados com objetivos de esclarecer se o sangue periférico e a medula óssea são comparáveis como fontes de células tronco para transplantes alogênicos. Apesar disto, controvérsias substanciais permanecem a respeito do impacto sobre a doença do enxerto-*versus*-hospedeiro (DEvH), mortalidade ou incidência do relapso. (KOCA e CHAMPLIN, 2008).

A maior análise que comparou resultados globais de estudos aleatórios encontrou uma diminuição nas taxas de relapso e um risco aumentado de GvHD crônica para pacientes que receberam células tronco do sangue periférico (STEM CELL TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2005). Isto sugere que a GvHD crônica possa ser um marcador importante para um efeito ativo do transplante-*versus*-doença e possa ser responsável pela redução nas taxas de relapso e o aumento na sobrevivência observada em pacientes que recebem células tronco do sangue periférico.

Considerando que a associação entre as células tronco do sangue periférico e uma mais elevada incidência da GvHD crônica foi confirmada por quase todos os estudos, a relação com uma incidência aumentada da GvHD aguda são ainda controversas. A maioria dos ensaios clínicos encontraram uma incidência similar da GvHD aguda após transplante de células tronco do sangue periférico e medula óssea.

Os dados clínicos do grupo Espanhol para Transplante Hematopoiético, no período de 1994 a 2006, indicaram que nenhuma diferença foi encontrada entre fonte de células tronco e a incidência de relapso e sobrevivência livre da doença, mesmo quando focalizaram a análise em pacientes transplantados em fases avançadas da doença. Similarmente, não foram observadas diferenças na sobrevivência total em dez anos entre os pacientes transplantados com medula

óssea ou sangue periférico (GALLARDO et al., 2009). Este estudo demonstrou que o uso de células tronco do sangue periférico como fonte no transplante alogênico entre doadores irmãos HLA idênticos esteve associado com ambas as formas, crônica e aguda, da doença do enxerto-*versus*-hospedeiro.

O transplante com doadores não relacionados tem sido mais comum que transplantes autólogos, contribuindo para o desenvolvimento de Registros Nacionais e Internacionais de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO). Essa iniciativa tem resultado num sistema de cooperação entre serviços de transplante, que muito tem beneficiado pacientes que aguardam por doador compatível.

Decorrente das condições biológicas associadas à genética da compatibilidade tecidual, somente um em quatro pacientes tem possibilidade de encontrar um doador HLA compatível entre irmãos. Dessa forma, a busca ao registro de doadores tem sido uma alternativa freqüente, o que implica no aumento significativo de transplantes entre não aparentados e na necessidade crescente do aumento do número de doadores nessas instituições.

No Brasil, aproximadamente 30% dos pacientes com indicação de TCPH encontram seu doador HLA compatível na família. Para os demais resta a alternativa de busca ao **Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea (REDOME)** e Registros Internacionais similares, onde as chances de se encontrar um doador HLA idêntico podem chegar de uma em um milhão.

O REDOME reúne informações (nome, endereço, resultados de exames, características genéticas) de pessoas que se dispõem a doar medula para o transplante. Foi criado em 1993, por José Roberto Feresin de Moraes, e até 1998 ficou instalado no instituto Pró Sangue em São Paulo. Em 1998, foi transferido para o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Rio de Janeiro, onde atualmente se encontra. Nos anos seguintes estruturou-se e foi reconhecido como parte do Sistema Nacional de Transplante (SNT) do Ministério da Saúde e, atualmente constitui um dos importantes programas de atendimento à saúde do SUS, contando até março de 2009 com quase um milhão de potenciais doadores cadastrados.

Caso o paciente não possua doador aparentado, suas informações genéticas HLA deverão ser inseridas num cadastro único destinado a pacientes e denominado **Registro Brasileiro de Receptores de Medula Óssea (REREME)**. A conexão entre esses dois bancos de dados -REDOME e REREME- permitirá a

localização e o transplante quando ocorrer deverá atender a critérios de priorização tais como, tempo de entrada no cadastro, grau de urgência, doença de base e possibilidade de cura.

O Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (LIGH-UFPR) faz parte da rede de laboratórios nacionais credenciados pelo SUS para realizar para o REDOME tipagens HLA de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO). Informações disponíveis no site: <http://www.ligh.ufpr.br/>

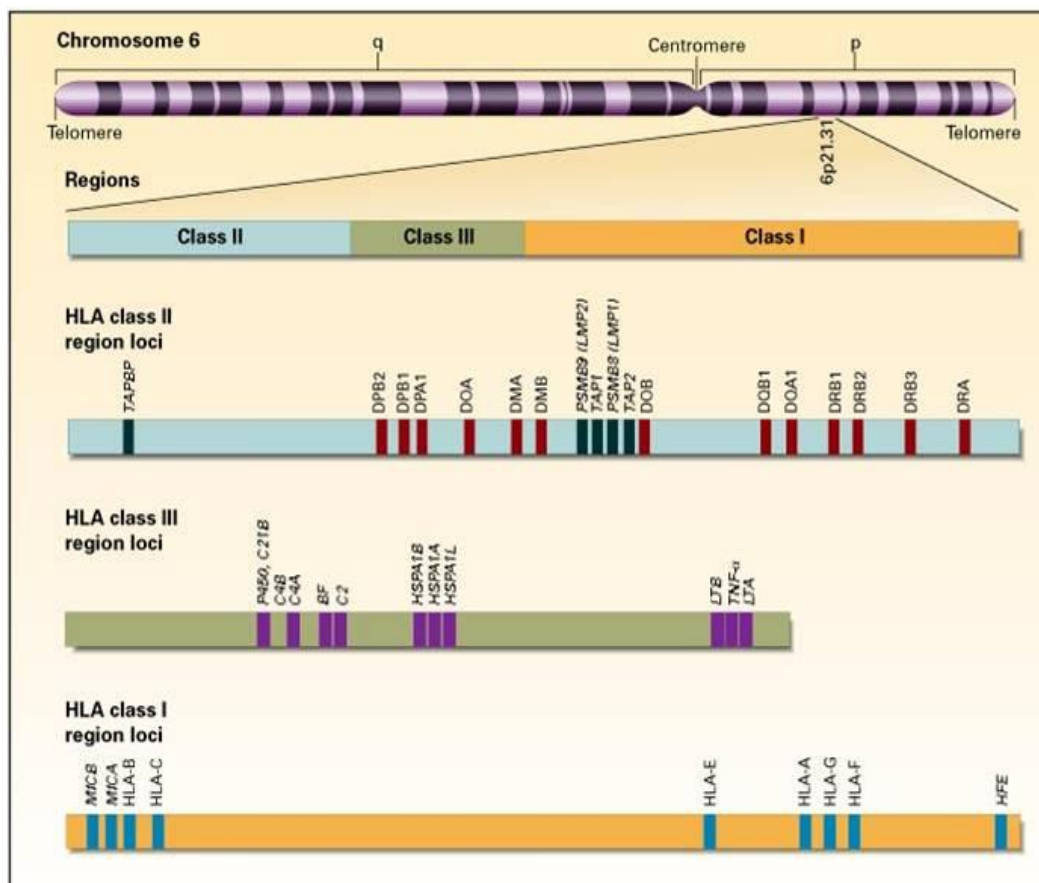
## 2.2. O MHC humano

A identificação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na espécie humana ocorreu na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood. (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Estes autores descobriram que alguns anticorpos, presentes no soro de indivíduos politransfundidos, eram reativos a antígenos presentes em leucócitos. Estudos genéticos relacionados a esses aloantígenos, bem como estudos sorológicos e moleculares realizados em *workshops* internacionais de histocompatibilidade, permitiram a identificação de vários locos gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.31) (FIGURA 1). Essa região do genoma, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (FIGURA 1) (LAMM et al., 1985; BELL, 1989; CHRISTANSEN et al., 1994) de acordo com a estrutura e função dos produtos dos genes nela situados. Estes genes codificam aloantígenos expressos na superfície de leucócitos, os quais receberam a designação de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Cada molécula HLA consiste em uma fenda (ou sulco) extracelular que se liga a peptídeos proteicos, seguido de um par de domínios semelhantes à Imunoglobulina. A proteína HLA é ancorada à membrana celular por regiões transmembrânicas e citoplasmáticas. As moléculas HLA são subdivididas em classe I e II. As moléculas de classe I são heterodímeros constituídos de uma cadeia  $\alpha$  composta por três domínios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) ligada de forma não covalente a uma molécula de  $\beta_2$ -microglobulina. Proteínas de classe II são heterodímeros formados por uma cadeia  $\alpha$ , com dois domínios ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), e uma cadeia  $\beta$ , também com dois domínios ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Suas características e diferenças estão representadas na tabela 2 e na figura 2.



FIGURA 1. Localização e estrutura do MHC humano



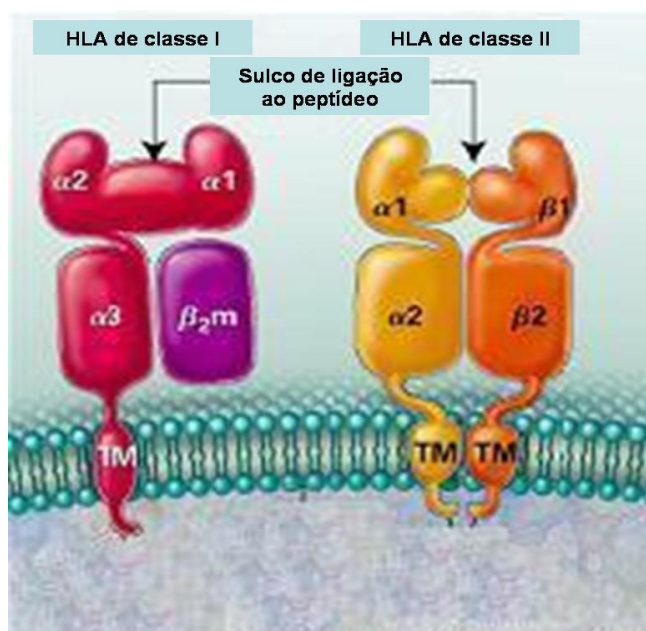
**Figura 1.** Localização do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) humano. Disponível em [http://nejm.org/teaching\\_tools/jpegs\\_large/klei.fig1.jpg](http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg), acesso em Novembro de 2008)

TABELA 2. Características das moléculas HLA de classe I e II

Característica	HLA de classe I	HLA de classe II
Cadeias polipeptídicas	$\alpha$ (44-47 kD) $\beta_2$ -microglobulina (12 kD)	$\alpha$ (32-34 kD) $\beta$ (29-32 kD)
Localização de resíduos de Aác polimórficos	Domínios $\alpha_1$ e $\alpha_2$	Domínios $\beta_1$ e $\beta_2$
Local de ligação para co-receptores da célula T	A região $\alpha_3$ liga CD8 (de linfócitos T CD8+)	A região $\beta_2$ liga CD4 (de linfócitos T CD4+)
Tamanho da fenda de ligação de peptídeos	Acomoda peptídeos com 8-11 Aác	Acomoda peptídeos com 10-30 Aác
Locos	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

Aác = aminoácidos

FIGURA 2. Estrutura das moléculas HLA de classe I e de classe II



**Figura 2.** TM = região transmembrânica. Moléculas de classe I formadas por um heterodímero constituído por uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia leve denominada  $\beta_2$ -microglobulina, enquanto que moléculas de classe II formam um heterodímero de uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ .

A descoberta deste sistema de histocompatibilidade deu início à área clínica em crescente expansão de transplante de órgãos e tecidos. Em humanos, os genes HLA, codificam proteínas que auxiliam no processo de imunomodulação da resposta imune, e no reconhecimento do próprio e do não próprio (células e tecidos) por células do sistema imune e sua principal função é apresentar antígenos estranhos a linfócitos T.

Embora a compatibilidade HLA entre doador-receptor seja um requisito fundamental para o sucesso do transplante, o papel dos anticorpos, células apresentadoras de antígenos, células T helper e citotóxicas, moléculas de superfície de células do sistema imune, mecanismos de sinalização e outros mecanismos efetores da resposta imune, não foram totalmente elucidados e necessitam de maiores esclarecimentos.

### 2.3. Células *Natural Killer*

As células *NK* (*Natural Killer*) são linfócitos derivados da medula óssea que possuem importantes funções na regulação da resposta imune inata. Entretanto, baseado em sua linhagem de origem, repertório de receptores e funções efectoras, as células *NK* parecem ser um tipo celular transicional, que seria uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo (LANIER, 2005). Estas células são componentes cruciais no controle imune de células tumorais, células infectadas por vírus e células sob “stress” (TRINCHERI, 1989; DOKUN et al., 2001; BRUTKIEWICZ & WELSH, 1995; MORETTA et al., 2002; FRENCH & YOKOYAMA, 2003; LONG, 2002), além de participar da rejeição em transplante de medula óssea em modelos experimentais murinos (BIX et al., 1991). Um sofisticado repertório de receptores de superfície celular controla sua ativação, proliferação e funções efectoras (SPITS, et al. 1998).

Mais do que ser regulada por apenas um receptor, as células *NK* parecem atuar pela integração de inúmeros sinais provenientes de vários receptores. Sua ativação é controlada por receptores inibidores que, presumivelmente funcionam como um sistema “a prova de falhas”, evitando assim estimulação inadvertida, a qual resultaria em dano às células normais do organismo (LANIER, 2005). O reconhecimento de células alvo, por células *NK* envolve a ligação e interação entre receptores ativadores e inibidores presentes em sua membrana celular com moléculas ligantes na superfície da célula alvo, além da integração de sinais transmitidos por estes receptores determinando se a célula deve ou não ser ativada. No caso de ativação, a célula *NK* responde reorganizando e liberando grânulos citotóxicos, além da transcrição e secreção de citocinas (LANIER, 2005). As *NK* estão prontas para agir, expressam constitutivamente transcritos para granzimas (proteases da mesma família das enzimas digestivas tripsina e quimiotripsina) e perforinas (proteínas que se polimerizam ao serem secretadas para gerar poros na membrana da célula alvo). Conseqüentemente sua resposta lítica pode ser ativada em minutos sem requerer transcrição, tradução ou proliferação celular (LANIER, 2005). Os mecanismos, envolvidos na ativação e na inibição destas células, estão aos poucos sendo elucidados, sendo a hipótese do “*missing-self*” (perda do próprio) (KÄRRE, 1985; KÄRRE, 2002) a mais aceita atualmente.

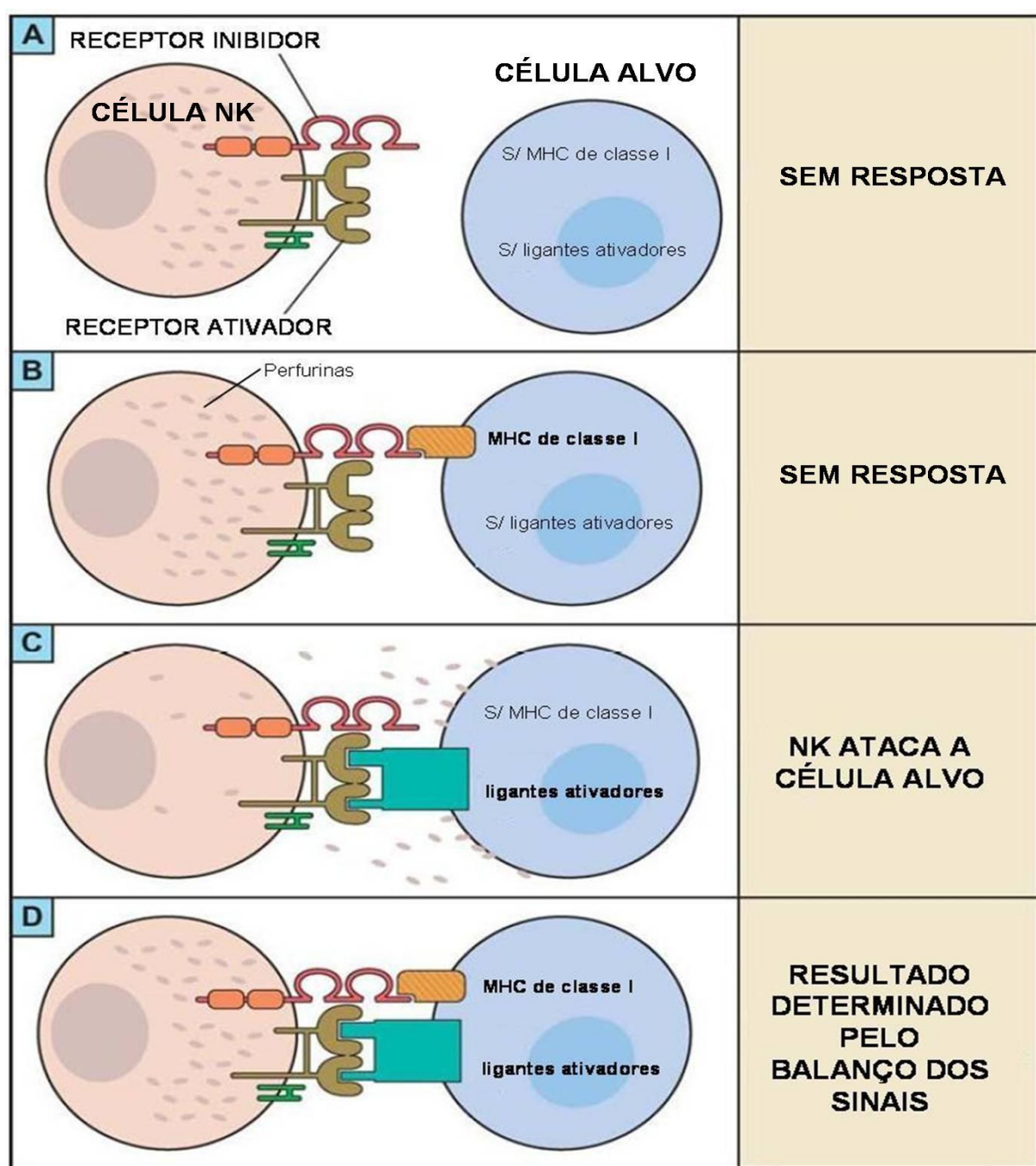
### 2.3.1. Hipótese do “*Missing-Self*” (Perda do Próprio)

A participação de células *NK* em múltiplos aspectos da resposta imune inata e adaptativa é implementada por um amplo arranjo de receptores ativadores e inibidores presentes em sua superfície. A integração de redes complexas de sinalização dirige as respostas de células *NK* (STEWART et al., 2006).

Inicialmente as células *NK* foram descritas como não restritas ao MHC em seu processo de reconhecimento de células alvo, devido a sua capacidade de lisar células alvos que não expressavam *MHC* próprio ou apresentavam expressão de MHC alogênico. Contudo, KARRE e colaboradores notaram que, mais do que ignorar o MHC, as células *NK* parecem ser ativamente inibidas de uma resposta citotóxica quando elas encontram células tumorais que expressam certas moléculas MHC de classe I (KÄRRE, 1985). Subseqüentemente, foi demonstrada a habilidade das *NK* em reconhecer e eliminar células hematopoiéticas normais que não expressam moléculas MHC de classe I, em um estudo de rejeição de células da medula óssea dependente de células *NK* de camundongos singênicos deficientes de  $\beta_2$ -microglobulina (BIX, et al. 1991; HOGLUND, et al. 1991). De acordo com a hipótese “*Missing-self*” (LJUNGGREN & KARRE, 1990), as células *NK* exercem a imunovigilância monitorando células que tenham diminuição da expressão de moléculas MHC de classe I, geralmente expressa em células nucleadas saudáveis, mas com níveis de expressão baixo ou ausentes, como resultado de infecção viral ou transformação celular neoplásica (LJUNGGREN e KARRE, 1990). Até recentemente, aceitava-se que as células *NK* lisavam quaisquer células que não expressam ligantes MHC de classe I para receptores inibidores das *NK* (LANIER, 2005). Uma modificação contemporânea dessa hipótese “*missing-self*” indica que células *NK* patrulham por células anormais, as quais não expressam ou possuem uma expressão reduzida de moléculas MHC de classe I ou uma expressão aumentada de ligantes para receptores ativadores das células *NK* (FIGURA 3).

Evidências experimentais têm permitido sugerir que receptores inibidores para MHC de classe I possam servir somente para atenuar, mais do que inibir completamente, as funções efectoras das células *NK* e que, a quantidade de proteínas MHC I na superfície celular do alvo é proporcional ao grau de inibição.

FIGURA 3. HIPÓTESE “MISSING-SELF” REVISADA



**Figura 3.** Hipótese “Missing-self” revisada. Representação do encontro entre uma célula *NK* e a célula alvo e possíveis resultados. A) Em algumas circunstâncias, receptores inibidores da célula *NK* (diferentes dos *KIR*) reconhecendo outros ligantes que não as proteínas MHC de classe I podem suprimir respostas das células *NK*. B) A expressão de moléculas MHC de classe I ligantes para os receptores inibidores *KIR* desabilita a resposta, além da não expressão de ligantes ativadores. C) A não expressão da molécula MHC I ligante do receptor inibidor *KIR* conjuntamente com a expressão de ligantes para receptores ativadores resultam em mecanismos responsivos efetores. D) Quando interagem com células alvo expressando ligantes para ambos receptores ativadores e inibidores, o resultado é determinado pela soma da extensão dos sinais. A quantidade dos receptores ativadores e inibidores nas células *NK* e a quantidade de ligantes nas células alvo, tanto quanto diferenças qualitativas nos sinais transduzidos, determinam à extensão da resposta das células *NK*. FONTE: LANIER, L.L. *NK cell recognition*. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

Modelos experimentais predizem que, quando múltiplos receptores ativadores de células *NK* são engajados simultaneamente (LANIER, et al. 1997) ou quando apenas um potente receptor ativador é adequadamente estimulado (CERWENKA, et al. 2001; DIEFENBACH, et al. 2001), as células *NK* são capazes de eliminar células alvo mesmo com a interação de seus receptores inibidores com ligantes específicos MHC de classe I.

Por outro lado, uma das características marcantes dessa hipótese admite que a falha na resposta das células *NK* a alvos potenciais pode ser devido à ativa inibição mediada por receptores inibidores ou alternativamente, devido à ausência de sinais de ativação suficientes para iniciar a resposta (LANIER, 2005). Um exemplo dessa situação seria a não resposta das células *NK* aos eritrócitos, sabendo-se que estes não expressam moléculas MHC I em sua superfície. Uma explicação seria que junto a não expressão de MHC I, existiria também a falta de ligantes capazes de se ligarem com receptores ativadores das *NK*. Outra explicação alternativa para a incapacidade das células *NK* de danificar tecidos normais, com baixos níveis de expressão de MHC I (ex. tecidos neurais) ou nenhuma expressão (ex. eritrócitos), é a possibilidade de que esta proteção da célula alvo seja mediada por receptores inibidores que reconhecem ligantes não MHC I (LANIER, 2005).

É difícil admitir que as células *NK* tenham primariamente evoluído para rejeitar tumores e certamente menos ainda, rejeitar células não transplantadas (autólogas). Sendo assim, se propôs que a morte de células autólogas infectadas por vírus, seria uma provável força direcional para a evolução do reconhecimento da “perda do próprio” (“*Missing-self*”) (KIESSLING et al. 1975; KÄRRE, 1985).

A hipótese do “*missing-self*” não explica inteiramente o mecanismo de ativação de células *NK* e de proteção de algumas células próprias normais com baixa ou nenhuma expressão de MHC contra o ataque de células *NK* (LIAO et.al, 1991). Isto conduziu ao deslocamento do paradigma no papel das células *NK* como “células nulas” a ser a primeira linha de defesa. Conseqüentemente, pela presença de receptores de ativação em células *NK* e ligantes em células infectadas ou transformadas foi suposta a hipótese do reconhecimento próprio induzido (‘induced self-recognition’) (DIEFENBACH e RAULET, 1991). De fato, múltiplos receptores de ativação que reconhecem proteína própria (LANIER, 2005) têm sido implicados no ataque de células *NK* a células viralmente infectadas ou células transformadas, suportando a hipótese do reconhecimento

próprio induzido de células *NK*. Ao longo desta linha, o receptor ativador de célula *NK* de camundongo, Ly49H demonstrou reconhecer proteína codificada viralmente semelhante ao MHC produzida pelo citomegalovírus, m157 (ARASE et al., 2002).

### 2.3.2. Diferentes Estruturas de Reconhecimento das Células *Natural Killer*

#### 2.3.2.1. Receptores de células *NK* que reconhecem ligantes não MHC

As células *NK* possuem vários sistemas de receptores de membrana que evoluíram para detecção de moléculas MHC de classe I e moléculas relacionadas ao MHC I, as quais regulam suas respostas citolíticas. Contudo, estas células possuem mecanismos adicionais que regulam seu comportamento quando se trata de alvos potenciais que não expressam proteínas MHC ou relacionados (LANIER, 2005). Não está claro ainda se receptores com ligantes não MHC possam servir como receptores “coestimulatórios”, aumentando a sinalização de outros receptores, ou independentemente iniciar uma resposta. Dois destes receptores com ligantes não MHC estão listados abaixo, os receptores 2B4 e DNAM-1.

##### Receptor **2B4**

O receptor 2B4 (também denominado CD244) e seu ligante CD48 (BROWN et al., 1998; LATCHMAN et al., 1998) são membros da família CD42 de proteínas relacionadas à Imunoglobulinas (Ig), codificadas por um grupo de genes localizados no cromossomo 1 humano (1q22). Estes receptores estão presentes em todas as células *NK*, na maioria das células T TCR<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  e das células T CD8<sup>+</sup> (tipicamente o grupo de células com o fenótipo efetor/memória) (GARNI-WAGNER et al., 1993; VALIANTE & TRINCHIERI, 1993; PERITT et al., 1999; SPEISER et al., 2001), além de monócitos e basófilos (NAKAJIMA et al., 1999). Entretanto, se este receptor 2B4 é capaz de ativar funções efetoras independentemente ou servir como um receptor “coestimulador”, não está ainda definido (VALIANTE & TRINCHIERI, 1993; KUBIN et al., 1999; NAKAJIMA et al., 1999; SIVORI et al., 2000).

##### Receptor **DNAM-1**

O receptor DNAM-1 (também denominado CD226) é membro da superfamília das Ig, sendo codificado por um gene localizado no cromossomo 18 humano (18q22.3), que se expressa em células *NK*, células T, um grupo de



células B, monócitos e plaquetas (BURNS et al., 1985; SCOTT et al., 1989; SHIBUYA et al., 1996).

#### 2.3.2.2. Receptores de células *NK* que reconhecem ligantes relacionados ao MHC

São receptores, dentre os quais o NKG2D, que reconhecem proteínas de superfície celulares estruturalmente relacionadas com o MHC I, sendo a maioria destes ligantes não codificados por genes situados no complexo MHC e não possuem estruturas de ligação a peptídeos para a apresentação de antígenos às células T.

##### Receptor **NKG2D**

O receptor NKG2D reconhece glicoproteínas de superfície celular estruturalmente relacionadas ao MHC I. Diferentemente de outros receptores das células *NK*, o NKG2D é codificado por apenas um gene não polimórfico localizado no cromossomo 12 (12p12.3-p13.2) (HOUCHINS et al., 1991; SHUM et al., 2002) que codifica um receptor essencialmente ativador. Todas as células T CD8+ expressam constitutivamente o NKG2D (BAUER et al., 1999). Este receptor liga-se a uma família de proteínas com homologias estruturais às moléculas MHC I, como MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 e ULBP4 (BAUER et al., 1999; COSMAN et al., 2001; JAN et al., 2003). Destes, apenas os MICA e MICB são codificados por genes localizados no complexo MHC (ligados ao *HLA-B*) (BAHRAM et al., 1994).

A estimulação de células *NK* através do NKG2D ativa a citotoxicidade mediada por célula e, em alguns casos, induz a produção e a secreção de citocinas e quimiocinas (LANIER, 2005). Os receptores NKG2D têm sido implicados na imunidade contra vírus e células tumorais.

### 2.3.2.3. Receptores de células *NK* que reconhecem ligantes MHC de Classe I

Receptores reconhecendo moléculas MHC de classe I “clássicas” e “não clássicas” codificadas por genes localizados no complexo MHC têm sido identificados, como a família de receptores CD94/NKG2, os Receptores semelhantes à Ig Leucocitários - LILR (do inglês, *leukocyte Ig-like receptors*) e os Receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer* – *KIR* (do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*).

Não existem ainda evidências aceitáveis de que células *NK* reconheçam moléculas MHC de classe II, baseadas em análises de camundongos deficientes de MHC II e em estudos funcionais *in vitro*, usando células alvo humanas e murinos expressando MHC de classe II (LANIER, 2005).

#### Receptor **CD94/NKG2**

As famílias gênicas NKG2 e CD94 codificam receptores que reconhecem ligantes MHC I “não convencionais” (ex. *HLA-E*). Estes genes estão situados no complexo *NK* localizados no cromossomo 12 humano (12p12.3-p13.2). Em humanos um único gene *CD94* está intimamente ligado a quatro genes da família NKG2 (*NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E* e *NKG2F*) (HOUCHINS et al., 1991). Diferente de outros genes codificantes de receptores, os genes *CD94* e *NKG2* possuem pouca variação alélica, o que tem demonstrado não afetar as funções destes receptores (SHUM et al., 2002). Ambos os genes codificam proteínas transmembrânicas do tipo II, da família semelhante à lectina do tipo C (FIGURA 4). Os receptores CD94/NKG2 são expressos na maioria das células *NK* e células T  $\text{TCR}^+ \gamma\delta$  e em um subgrupo de células T  $\text{CD8}^+ \text{TCR}^+ \alpha\beta$  (ARAMBURU et al., 1990; TOYAMA-SORIMACHI et al., 2001). Diferentemente dos receptores *KIR*, que são estavelmente mantidos uma vez expressos, a expressão dos receptores CD94/NKG2 nas células *NK* e células T é modulada por citocinas do ambiente.

## Receptor **LILR**

A família dos genes *LILR* (também conhecidos por *LIR*, *ILT* e *CD85*) está localizado no LRC (Complexo de Receptores Leucocitários, do inglês *Leukocyte Receptor Complex*) no cromossomo 19 (19q13.4), próxima aos genes *KIR*. Dos três genes *LILR*, dois, *LILRB1* (ILT2/LIR1) e *LILB2* (ILT4 LIR2), codificam receptores inibidores que ligam moléculas MHC I (COLONNA et al., 1997; COSMAN et al., 1997). Entretanto, *LILB2* não é expresso em células *NK*.
















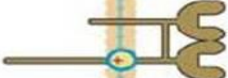

O receptor *LILB1* é uma glicoproteína de superfície celular com quatro domínios semelhantes à *Ig* na região extracelular e quatro ITIMs (Motivo Inibidor baseado em Tirosina) no domínio citoplasmático (FIGURA 4). É variavelmente expresso em células *NK* do sangue periférico (variando de níveis indetectáveis até 75% das células *NK*) e em um subgrupo de células T, mas é uniformemente e altamente expresso em células B e monócitos (COLONNA et al., 1997; COSMAN et al., 1997). Esta expressão aumentada do receptor *LILB1* em células B sugere que este receptor tenha um papel significativo na regulação destes leucócitos, uma vez que as células B não expressam receptores *KIR* e nem *CD94/NKG2* (LANIER, 2005).





## Receptor **KIR**

Os receptores semelhantes à *Ig* das células *Natural Killer* (*KIR – killer cell immunoglobulin-like receptor*) são membros de um grupo de moléculas reguladoras encontradas na superfície das células *NK* e subpopulações de células T. Os *KIRs* foram primeiramente identificados por sua habilidade de conferir alguma especificidade na citólise mediada por células *NK* (HAREL-BELLAN et al., 1986; MORETTA et al., 1990). Esta especificidade se dá através da interação de isotipos de moléculas *KIR* com moléculas HLA de classe I. Essa interação protege células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células *NK*. Entretanto, outros isotipos *KIR* podem estimular esta atividade (CARRINGTON & NORMAN, 2003). Análises de clones *NK* revelaram que células clones expressam diferentes grupos de *KIRs* inibidores ou ativadores, havendo uma seleção combinatória de receptores a serem expressos por uma célula e seus clones, entretanto cada clone expressa pelo menos um receptor inibidor (MINGARI et al., 1995; MORETTA et al., 2003; VIVIER & ANFOSSI, 2004). Portanto, em um indivíduo, os clones de células *NK* são distinguidos pela

combinação de genes *KIR* que expressam, sendo que esses padrões são estabelecidos durante o desenvolvimento da célula *NK* e permanecem estáveis (PARHAM, 2004).

FIGURA 4. RECEPTORES DAS CÉLULAS NK COM LIGANTES MHC I

Receptores Humanos	Ligantes
KIR3DL3 	?
KIR2DL3 	HLA-CS77N80
KIR2DL2 	HLA-CS77N80
KIR2DL1 	HLA-CN77K80
KIR2DL4 	HLA-G?
KIR3DL1 	HLA-Bw4
KIR3DS1 	?
KIR2DL5A/B 	?
KIR2DS3 	?
KIR2DS5 	?
KIR2DS1 	HLA-Cweakly
KIR2DS2 	?
KIR2DS4 	HLA-Cweakly
KIR3DL2 	HLA-A
CD94/NKG2A 	HLA-E
CD94/NKG2C 	HLA-E
LILRB1 	HLA-A, B, C, E, F

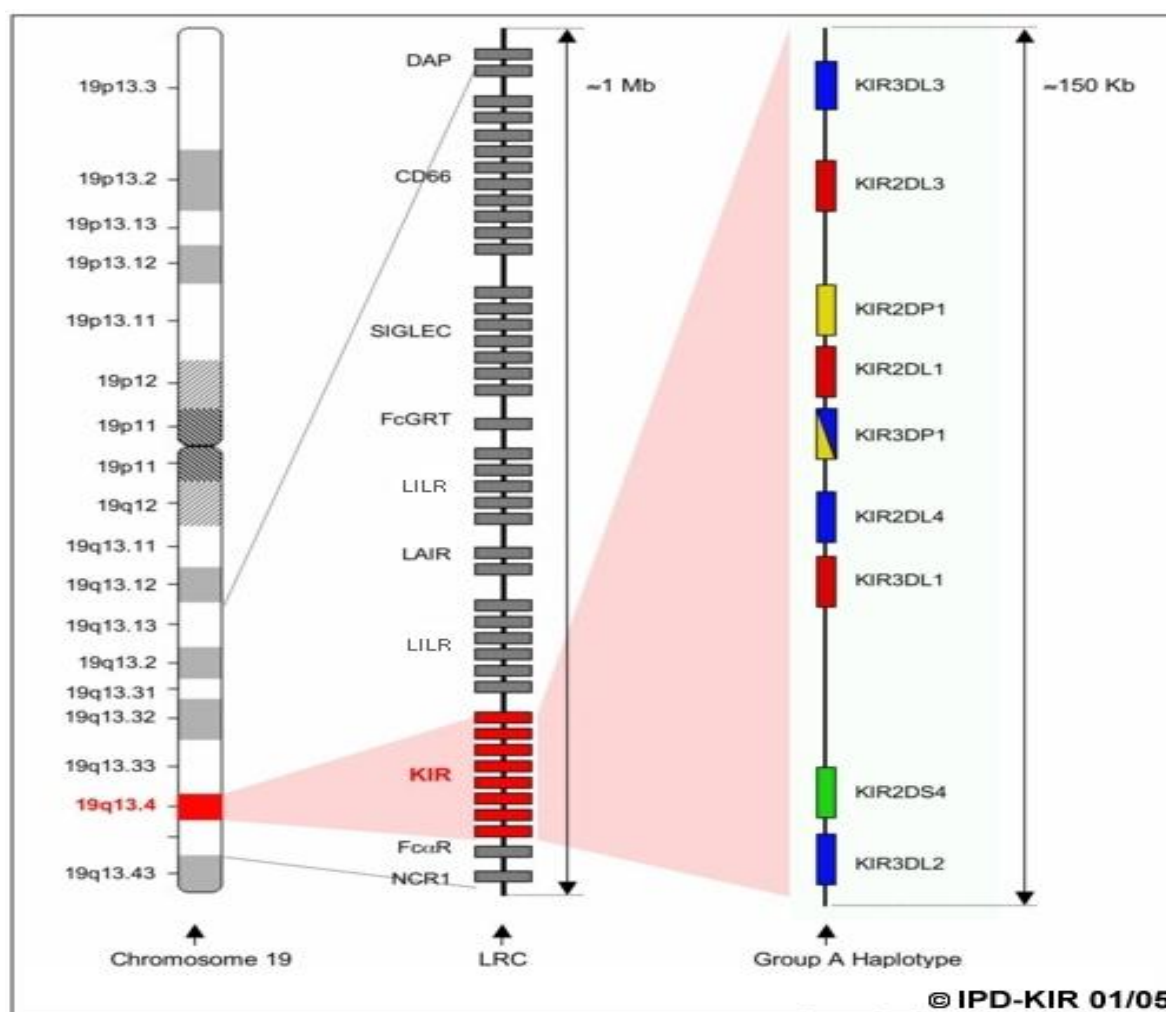
 Domínio lectina-C
 Domínio Ig
 ITIM
 K/R

**Figura 4.** Representação gráfica dos receptores de célula NK para ligantes MHC de classe I. Receptores Inibidores: *KIRs* inibidores (ex. *KIR2DL* e *KIR3DL*), LILB1 e CD94/NKG2A contendo ITIMs (motivos inibidores baseados em tirosina) em seus domínios citoplasmáticos. Receptores Ativadores: Proteínas CD94/NKG2C e algumas moléculas *KIR* faltando os ITIMs em sua cauda, possuindo um resíduo carregado em seus domínios transmembrana, resíduos estes de ligação com proteínas adaptadoras (DAP12) com ITAMs (motivos de ativação baseado em tirosina) (ex. *KIR2DS* e *KIR3DS*). O *KIR2DL4* é uma exceção, possui o domínio citoplasmático com ITIM e está associado com uma proteína adaptadora. E ligantes MHC de classe I. O símbolo ? significa ligante desconhecido ou duvidoso. FONTE: LANIER, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

## 2.4.LRC (*Leukocyte Receptor Complex*)

Os genes *KIR* localizam-se no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), em um complexo gênico de 1Mb denominado de *LRC* (Complexo de Receptores Leucocitários - *Leukocyte Receptor Complex*) (FIGURA 5).

FIGURA 5. REGIÃO CROMOSSÔMICA DO *LRC* E DOS *KIR*



**Figura 5.** Localização cromossômica do *LRC* (Complexo do Receptor Leucocitário) destacando os genes *KIR* que se situam no cromossomo 19 (19q13.4). Dentro do *LRC*, encontram-se várias famílias gênicas, dentre elas: os *LILRs* (*leukocyte Ig-like receptors*); os *ILTs* (*Ig-like transcripts*); os *KIRs* (*Killer-cell Ig-like Receptors*); os *GPVI* (*platelet collagen receptor glycoprotein VI*); os receptores de IgA Fc, *FCAR* e *NKp46*; além dos *LAIRs* (*Leukocyte-associated Ig-like Receptors*).  
 FONTE: MARTIN, A.; KULSKI, J. K.; WITT, C.; PONTAROTTI, P.; CHRISTIANSEN, F. T. Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Immunology* V.23: No.2; 2002.

Os genes *LRC* conhecidos podem ser agrupados, baseando-se na sua organização, filogenia e estrutura, em quatro famílias multi-gênicas. Estas são:  
 Família 1 - Receptores Leucocitários Semelhantes à Ig, *LILRs* (*leukocyte Ig-like*

*receptors*) e Transcritos Semelhantes à Ig, *ILTs* (*Ig-like transcripts*); Família 2 - Receptores semelhantes à Ig das Células *Natural Killer*, *KIRs* (*Killer-cell Ig-like Receptors*), Glicoproteína VI Receptor de Colágeno de Plaquetas, *GPVI* (*platelet collagen receptor glycoprotein VI*); Família 3 - um grupo representado pelos receptores de IgA Fc, *FCAR*, e *NKp46*; e Família 4 - Receptores Semelhantes à Ig Associados a Leucócitos, *LAIRs* (*Leukocyte-associated Ig-like Receptors*) (MARTIN et al., 2003). O *LRC* contém genes que expressam uma seleção de 30 receptores semelhantes à Ig, dependendo do haplótipo analisado. Os novos genes *LRC*, denominados de *LENGs* (*LRC - Encoded Novel Genes*), localizados na extremidade centromérica do complexo, não são estruturalmente relacionados aos Receptores Semelhantes à Ig. Estes incluem o *LENG5*, que expressa a subunidade SEN34 de uma endonuclease de recomposição de transferência de RNA e *LENG7* que expressa um fator de alongamento 1 (VALES-GOMEZ et al., 1998).

O complexo *LRC* mostra uma similaridade evolutiva e estrutural ao *MHC*, o qual está situado no cromossomo 6 humano e contém os locos gênicos *HLA* de classe I e II que codificam e expressam moléculas de superfície celular envolvidas na regulação da resposta imune (SHIMIZU & DEMARS, 1989). Alguns produtos do *MHC* de classe I são ligantes alvo de alguns membros da Família dos Receptores Semelhantes à Ig (MARTIN et al., 2004), como, por exemplo, as moléculas expressas pelos genes *KIR*. Embora a maioria dos ligantes dos receptores *LRC* sejam moléculas *HLA* de classe I, uma família de genes na extremidade telomérica do *LRC* (compreendendo *FCAR*, *NKp46* e *GPVI*), expressa receptores que interagem com ligantes não *HLA* (MARTIN et al., 2003).

## 2.5. GENES *KIR*

Os genes *KIR* variam em comprimento de 4 a 16Kb (seqüência genômica completa) e podem conter de 4 a 9 éxons. Codificam proteínas reguladoras referidas como Receptores Semelhantes à Ig das Células *Natural Killer* (*KIRs*).

Os genes *KIR* classificam-se em três grupos, de acordo com suas características estruturais:

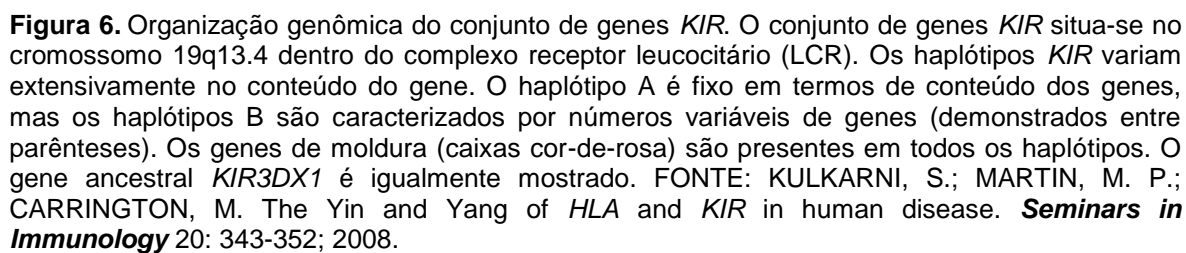
- 1) **Genes *KIR2D* Tipo I** codificam proteínas com dois domínios extracelulares com uma conformação D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Incluem-se os genes *KIR2DS1-5*, *KIR2DL1-3* e o pseudogene *KIR2DP1*. Estes genes possuem oito éxons, sendo o éxon 3 não codificante (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; WAGTMANN, et al., 1995; VILCHES, et al., 2000A e 2000B). Os genes *KIR2DL1* e *KIR2DL2* compartilham uma deleção comum no éxon 7, o que os distingue dos demais genes *KIR*. Já os genes *KIR2DS1-5* e os *KIR2DL1-3* diferem entre si pelo comprimento de sua cauda citoplasmática codificada pelo éxon 9.
- 2) **Genes *KIR2D* Tipo II** codificam proteínas com dois domínios extracelulares com uma conformação D<sub>0</sub> e D<sub>2</sub>. Neste grupo incluem-se os genes *KIR2DL4* e *KIR2DL5*, os quais possuem uma deleção característica do éxon 4 e diferem do grupo *KIR2D* Tipo I pelo éxon 3 ser codificante. O *KIR2DL4* tem o éxon 1 cerca de 6 nucleotídeos maior do que o éxon 1 dos demais *KIR*, além de possuir um códon iniciador diferente de outros genes.
- 3) **Genes *KIR3D*** codificam proteínas com três domínios extracelulares (D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>). Estes genes possuem os nove éxons e incluem os genes estruturalmente relacionados *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*. Dentro deste grupo os quatro genes diferem no comprimento de sua região codificante da cauda citoplasmática no éxon 9 (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; DOHRING, et al., 1996; TORKAR, et al., 1998). Este comprimento da cauda citoplasmática pode variar de 23 resíduos de aminoácido (codificados por alguns alelos do gene *KIR3DS1*) até 116 resíduos (codificados por alelos do gene *KIR2DL4*). O gene *KIR3DS1*



difere dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DL2* apresentar uma seqüência mais curta do éxon 8. Já o *KIR3DP1* difere dos demais por não possuir o éxon 6. A mais notável característica de um gene *KIR* se refere ao gene *KIR3DP1*, cujo segmento gênico do éxon 6 ao 9 foi deletado, e ocasionalmente também o éxon 2 (VILCHES, et al., 2000C).

Recentemente, um novo e divergente gene *KIR*, denominado *KIR3DX1*, com função desconhecida foi identificado aproximadamente 180 kb centromérico ao *cluster KIR* e entre dois *clusters LILR* (**Figura 6**). Este gene é conservado entre todos primatas, sugerindo que seja o gene ancestral no qual todos os outros *KIR* foram derivados (SAMBROOK et al., 2006). Interessantemente, enquanto foi mantido como uma única cópia nos primatas foi expandido no gado (GUETHLEIN et al., 2007). A variabilidade no conteúdo do gene e no locus *KIR* é devido em sua maior parte à duplicação do gene (MARTIN et al., 2004) , e a recombinação homóloga não-alélica (MARTIN et al., 2003).

Investigações da família de genes *KIR* em espécies primatas não humanas demonstraram que genes espécie-específico ultrapassam genes conservados. Tais características sugerem que novas variações *KIR* forneçam vantagens competitivas na sobrevivência ou reprodução de primatas, que são de duração curta na escala de tempo evolucionário (PARHAM, 2004).



## 2.6. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*

O subcomitê do *Human Genome Organization* (HUGO), denominado de Comitê de Nomenclatura para Fatores do Sistema *HLA* (WHO - *World Health Organization Nomenclature Committee*) foi designado para nomear os genes *KIR* e seus alelos (MARSH et al., 2003). A denominação do sistema gênico *KIR* leva em consideração a estrutura da proteína *KIR* e consiste de quatro grupos principais, divididos com base em duas características: número de domínios *Ig* extracelulares (2D ou 3D) e características da cauda citoplasmática da proteína *KIR*. Os genes que codificam proteínas com dois domínios extracelulares são representados por *KIR2D*. Enquanto que aqueles que têm como produto uma proteína com 3 domínios são *KIR3D*. Este sistema de nomenclatura separa ainda os *KIR2D* e *KIR3D* em dois grupos, considerando-se o tipo de cauda citoplasmática apresentada pela proteína. As moléculas *KIR* com cauda citoplasmática longa possuem na denominação, junto ao seu número de domínios extracelulares, a letra “L” (do inglês *Long*) indicando assim que a cauda citoplasmática é longa. Por exemplo, os genes *KIR2DL* ou *KIR3DL*. As moléculas que possuem a cauda citoplasmática curta são codificadas por genes designados pela letra “S” (do inglês *Short*), no caso *KIR2DS* e *KIR3DS* (OLCESE et al., 1997; LANIER et al., 1998). Os pseudogenes *KIR* são identificados pela letra “P” logo após o dígito correspondente ao tipo de domínio, como, por exemplo, nos pseudogenes *KIR2DP* ou *KIR3DP*. Após a nomeação destas duas características, o dígito final é correspondente aos diferentes locos (FIGURA 7). Quando dois ou mais genes *KIRs* possuem seqüências e expressam estruturas protéicas muito similares (entretanto não idênticas), a eles é dado o mesmo número, contudo são distinguidos por uma letra final, por exemplo, os genes *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* (MORETTA & MORETTA, 2004). A similaridade destes dois genes sugere que estejam relacionados por um evento recente de duplicação do gene (GOMEZ-LOZANO et al., 2002).

Há evidências indicando que os genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* se comportam como alelos do mesmo gene. É possível que futuramente os alelos destes genes estejam combinados sob um único nome do gene. Para evitar complicações, decidiu-se nomear os alelos de ambos os genes em uma única série numérica, assim 3DL1\*001-3DL1\*009 são seguidos por 3DS1\*010-3DS1\*014. Do mesmo

modo os alelos dos genes *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* foram nomeados igualmente em uma única série, por causa da similaridade destas seqüências (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/alleles.html>).

FIGURA 7. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*



**Figura 7.** Nomenclatura adotada pelo HUGO (*Human Genome Organization*).

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: janeiro 2009.

A maioria dos genes *KIR* apresenta variação alélica e esta diversidade tem sido designada com base na nomenclatura adotada para os locos *HLA* (GARDINER et al., 2001; SHILLING et al., 2002). Assim, os três primeiros dígitos, após a designação do loco, distinguem alelos cujas diferenças nas seqüências de éxons conferem mudanças não sinônimas. O quarto e quinto dígitos indicam alelos que se distinguem por diferenças na seqüência de bases dos éxons, mas que se referem a mutações sinônimas (MORETTA & MORETTA, 2004).

Existe ainda outro tipo de nomenclatura adotada na literatura, mas esta não se baseia na estrutura, função ou localização da proteína (HSU et al., 2002A). Esta nomenclatura é denominada de *CD* e consiste na ordem de proximidade centrômero-telomérica dos genes localizados no cromossomo 19.

## 2.7.NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS *KIR*

Em adição ao polimorfismo alélico, há uma variabilidade haplotípica devido a diferentes tipos e números de genes *KIR*. Devido à diversidade haplotípica ser a principal contribuinte para a diversidade *KIR* na população e repertório de células *NK*, houve um acordo entre o Comitê de Nomenclatura *KIR* que seria útil planejar um robusto e versátil sistema de nomenclatura que poderia ser usado para descrever o conteúdo dos genes de diferentes haplótipos *KIR*. Sugeriu-se que cada haplótipo *KIR* seria designado de 'KH' seguido de um hífen e então um único número de três dígitos atribuído seqüencialmente a indicação dos haplótipos diferentes. Este sistema permitiria que 999 haplótipos fossem nomeados.

Dois tipos de haplótipos *KIR* foram descritos com base no conteúdo dos genes, e são designados A e B. Nenhum único critério específico é suficiente para caracterizar todos os haplótipos do grupo A e B. Os haplótipos do grupo B são caracterizados por apresentar um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*. Contrariamente, os haplótipos do grupo A são caracterizados pela ausência desses genes. Como consequência destas diferenças, os haplótipos do grupo B possuem um número maior de genes codificando receptores *KIR* ativadores que os haplótipos do grupo A. Diversos investigadores têm usado critérios diferentes para distinguir os haplótipos do grupo A e do grupo B, e, certos haplótipos são designados diferentemente ao uso destes diferentes critérios (UHRBERG et al., 1997; HSU et al., 2002). O Comitê de Nomenclatura *KIR* notou que a distinção entre os haplótipos A e B é útil, tendo potencial biológico e significado médico e que os esforços devem ser feitos para desenvolver um conjunto de critérios consistente e lógico para distinguí-los. Foi proposto como uma parte da nomenclatura do haplótipo a letra A ou B seguida de um número com três dígitos. Por exemplo, um haplótipo pode ser nomeado KH-001A ou KH022B.

Visando fornecer maior informação e complementar a nomenclatura do haplótipo, foi sugerido que seguindo a designação do haplótipo, um código de 17 dígitos binários indicaria a presença e ausência de genes no haplótipo. Cada dígito no código representaria um gene distinto: '1' indicando presença do gene e '0' ausência de gene. Assim o nome completo do haplótipo poderia ser dado como: KH-001A-11100010011011011. Este sistema pode acomodar a descoberta de genes *KIRs* adicionais pela simples introdução de novos dígitos. Na medida do

possível a ordem dos genes na designação de todo o haplótipo poderia refletir sua ordem no genoma. Entretanto, quando novos dígitos forem adicionados para representar genes recentemente descobertos, estes serão colocados no final do código na ordem de suas descobertas (MARSH et al., 2003).

A nomenclatura para haplótipos *KIR* ainda não foi implementada (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>).

## 2.8. ESTRUTURA GÊNICA E VARIABILIDADE ALÉLICA

O conjunto de genes *KIR* localiza-se no cromossomo 19, ocupando cerca de 150kb de um complexo gênico denominado *LRC*. Vários genes *KIR* seguem um arranjo básico quanto à organização de sua estrutura éxon-íntron, sendo que os éxons 1 e 2 codificam a seqüência líder da proteína *KIR* e cada um dos domínios *Ig* corresponde a um único éxon: domínio  $D_0$  corresponde ao éxon 3, domínio  $D_1$  corresponde ao éxon 4 e  $D_2$  corresponde ao éxon 5. O éxon 6 é responsável pela região de ligação enquanto o éxon 7, pela porção transmembrânica. O domínio citoplasmático é codificado pelos dois éxons finais (éxons 8 e 9) (WILSON et al., 1997, 2000; TROWSDALE et al., 2001).

A organização genômica dos genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3* e todos os *KIR2DS*, conhecidos como *KIRs* com dois domínios *Ig* Tipo 1 (VILCHES & PARHAM, 2002), é a mesma que a dos genes codificadores de moléculas de 3 domínios, entretanto, o éxon 3 dos *KIRs* com 2 domínios não é codificante. Este pseudoexon pode ou não ser excisado por recomposição (possivelmente devido a uma deleção de 3 pares de bases) (VILCHES & PARHAM, 2002), causando a perda do domínio  $D_0$  na proteína codificada (VILCHES et al., 2000C).

Os *KIR2DS* tipo 2 incluem *2DL4*, *2DL5A* e *2DL5B* (VILCHES & PARHAM, 2002), que se caracterizam pela ausência completa do éxon 4 (SELVAKUMAR et al., 1997A), causando a perda do domínio  $D_1$  no produto protéico. Os genes *KIR3D* possuem toda a estrutura dos éxons intacta, com exceção dos *3DL3* os quais não apresentam o éxon 6. (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

Dois pseudogenes foram identificados e nomeados através de suas semelhanças com os genes *KIR*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*, podendo estar presentes em certos haplótipos. O *KIR2DP1* possui uma identidade de seqüência de aproximadamente 97% quando comparado aos *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*, e contém apenas os éxons 3 e 4. O segundo pseudogene, *KIR3DP1* é diferenciado por uma deleção de 1,5kb, que remove o éxon 2 (WILSON et al., 2000).

Existe uma similaridade de 91% compartilhada entre as seqüências promotoras da maioria dos *KIRs* (VALIANTE et al., 1997), o que sugere que os mesmos possam ser controlados por mecanismos similares. O promotor do *KIR3DL3* possui um valor menor de similaridade (89%), o que pode esclarecer a expressão reduzida de *KIR3DL3*. Alternativamente, o *KIR2DL4* é expresso em virtualmente 100% dos clones de *NK*, uma característica única do *2DL4*.

A maioria dos genes *KIR* contém sítios variáveis, enquanto que o restante mostra pouca variação (SELVAKUMAR et al., 1997; WITT et al., 2000; GARDINER et al., 2001; SHILLING et al., 2002). Um fator significativo que contribui para esta diversidade da região genômica *KIR* é o polimorfismo alélico (VALIANTE et al., 1997; SHILLING et al., 2002) gerado por mutações de ponto e recombinação homóloga (VALIANTE et al., 1997; SHILLING et al., 2002). Tais polimorfismos alélicos têm sido identificados para todos os genes *KIR* (HSU et al., 2002A). Esta variação pode ocorrer dentro de seqüências codificadoras responsáveis pela região de interação dos receptores *KIR* com as moléculas HLA de classe I, podendo interferir em tal interação (FAN et al., 1997, 2001; BOYINGTON et al., 2000; BOYINGTON & SUN, 2002). Nos genes *KIR*, variações nas seqüências nucleotídicas têm sido observadas em toda a extensão do gene, diferentemente da variação observada para os genes *HLA* de classe I e II, que é primariamente restrita a um ou dois éxons (HUGHES, 2002). O histórico de permutas desiguais e a similaridade de seqüências entre os *KIRs* têm dificultado a distinção de alelos de um mesmo loco e de locos diferentes (CARRINGTON & NORMAN, 2003).



## 2.9. ORGANIZAÇÃO GÊNICA

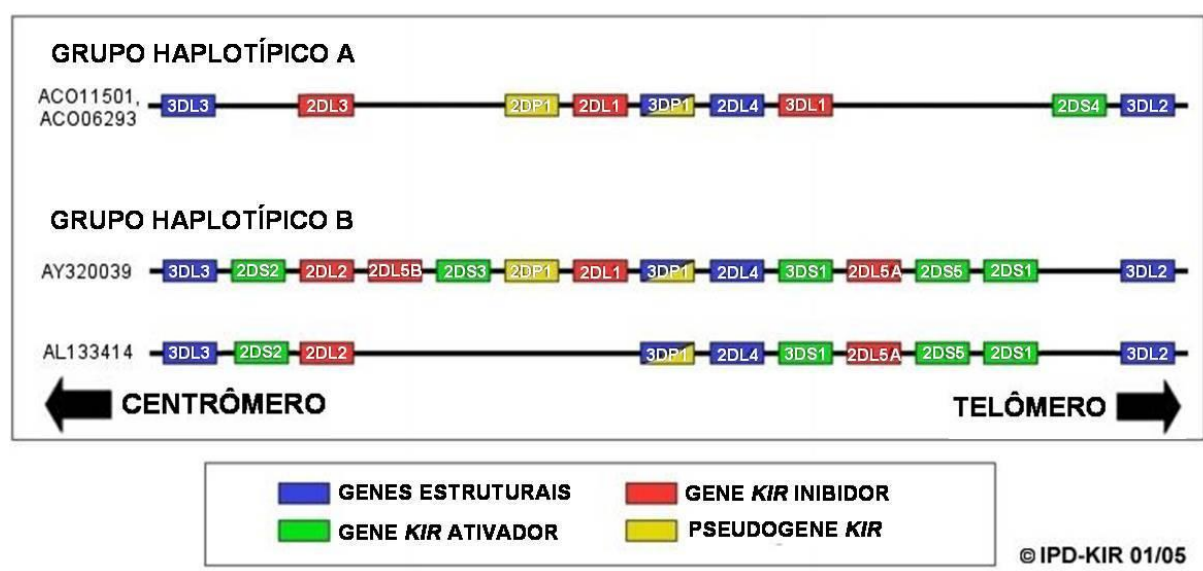
A ordem dos genes *KIR* determina dois haplótipos distintos (FIGURA 8 e FIGURA 9). Os genes estão organizados de forma “cabeça-a-cauda” (do inglês *head-to-tail*), e cada gene ocupa um comprimento de 10 a 16kb, com uma sequência intermediária de aproximadamente 2kb separando cada par de genes, exceto por uma sequência única de 14kb anterior ao *KIR2DL4*. Todos os haplótipos *KIR* conhecidos estão flanqueados em sua extremidade centromérica pelo loco *KIR3DL3* e em sua extremidade telomérica pelo *KIR3DL2*, além de dois locos centrais, os *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Estes genes presentes em todos os haplótipos são denominados “genes de moldura do haplótipo” (do inglês, *frameworks*) (VILCHES, et al., 2000B, 2002; WILSON et al., 2000; TROWSDALE, et al., 2001). A variação haplotípica encontrada no complexo *KIR* é devido à variação no número de genes que compõem o haplótipo, bem como pelo polimorfismo alélico em vários desses genes (SELVAKUMAR et al., 1997; UHRBERG et al., 1997; SHILLING et al., 2002). Investigações dos haplótipos *KIR* permitem sugerir uma história de duplicação gênica e permuta desigual nesta região (CARRINGTON & NORMAN, 2003). Com exceção dos *KIR* de “moldura”, o conteúdo gênico dos genes *KIR* dentro dos haplótipos varia de indivíduo para indivíduo, de tal modo que um haplótipo pode exibir menos de 8 ou mais de 14 genes e pseudogenes *KIR*, dependendo da presença ou ausência dos locos ativadores (UHRBERG et al., 1997; WITT et al., 1999; WILSON et al., 2000; HSU et al., 2002B).

A principal distinção entre estes dois haplótipos é o número de genes de receptores ativadores presentes. O haplótipo A tem sete genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*, contendo apenas um gene ativador, o *KIR2DS4*. O gene *KIR2DS4* possui um alelo nulo com uma frequência populacional de cerca de 84% (MAXWEL et al., 2002). Sendo assim, alguns indivíduos podem ser homozigotos para um haplótipo A no qual nenhum *KIR* ativador é expresso (HSU et al., 2002B). Enquanto que o haplótipo B possui várias combinações de genes ativadores: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* e *KIR2DS4*; além dos demais *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* (CARRINGTON & NORMAN, 2003). As frequências dos haplótipos A e B na população Caucasóide são similares; entretanto em relação ao conteúdo gênico, o haplótipo B possui uma maior variedade de subgrupos. Contudo existe

uma ampla variação destes entre diferentes etnias (WITT et al., 1999; NORMAN et al., 2001). O haplótipo A possui uma frequência de 75% em Japoneses e apenas 15% em Aborígenes Australianos (TONEVA et al., 2001; YAWATA et al., 2002).

O haplogrupo B possui uma maior variabilidade no número de genes *KIR* presentes, possuindo de um a cinco *KIRs* ativadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*) e podendo incorporar genes *KIR* inibidores os quais são conhecidos por estarem ausentes em haplogrupo A: *KIR2DL2* e *KIR2DL5* (UHRBERG et al., 2002). Técnicas de genotipagem *KIR* utilizadas em análise de segregação em famílias definiram pelo menos 20 haplótipos do grupo B (GOMEZ-LOZANO et al., 2002; HSU et al., 2002; UHRBERG et al., 2002). A diversidade haplotípica do grupo B está representada na Figura 10.

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS A E B



**Figura 8.** Representação dos haplótipos A e B. Diagrama representando a organização de 3 possíveis Haplótipos *KIR*. O grupo haplotípico A representa um típico Haplótipo *KIR* A, enquanto que o grupo B é demonstrado por dois dos possíveis haplótipos B, mostrando que este grupo haplotípico é bastante variável. ACO11501, ACO06293, AY320039 e AL133414 são os códigos de entrada dos dados seqüenciados no banco de dados do GenBank. Esta representação não está em escala.

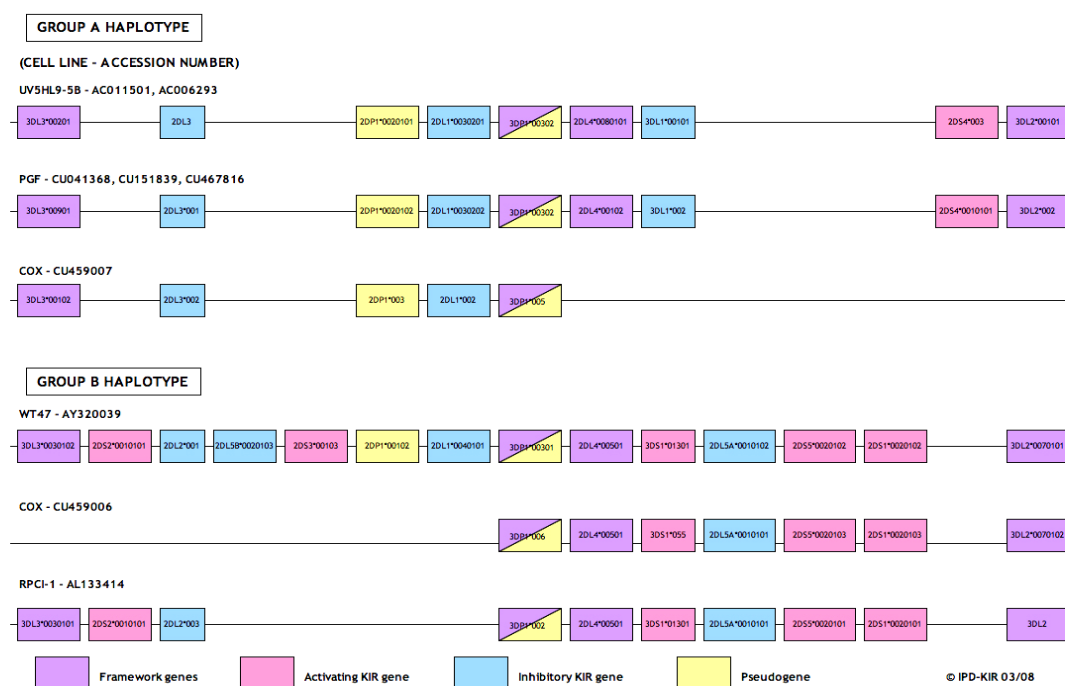
FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2008.

O aumento e a diminuição da região do *KIR* parece ter ocorrido devido, em parte, a permutas desiguais e duplicações gênicas. Uma consequência destes eventos moleculares é a possível geração de haplótipos *KIR* que contenham duas ou mais cópias de um mesmo gene em um único haplótipo e o rearranjo da ordem dos genes (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

O número de cópias dos genes *KIR* também é variável, com pelo menos dois genes sendo exibidos mais de uma vez por haplótipo (GOMEZ-LOZANO et al., 2002). Finalmente, o polimorfismo dos genes *KIR* é o maior contribuinte para a diversidade da região *KIR*, com múltiplos alelos conhecidos e provavelmente mais ainda a serem identificados para cada loco *KIR* (HSU et al., 2002A).

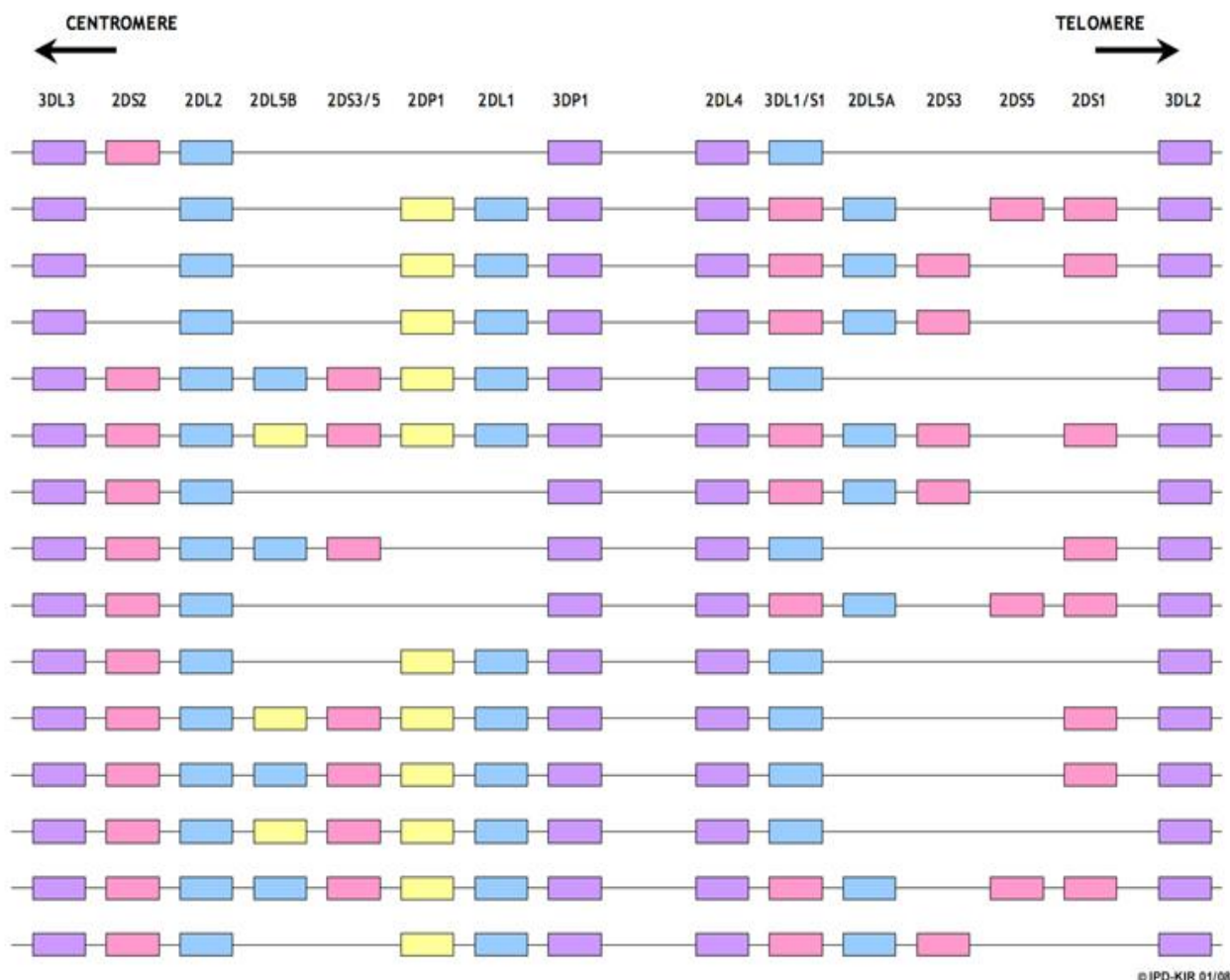
Os haplótipos *KIR* inicialmente foram descritos utilizando metodologia *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), baseados na presença de aproximadamente 24 Kb do fragmento *Hind III*, presente em haplótipos do grupo B e mais tarde relacionado à presença do gene *KIR2DL5* (UHRBERG et al., 1997; VILCHES et al., 2000). Atualmente tem sido utilizado outras técnicas como PCR-SSOP e sequenciamento genômico para genotipagem destes genes.

FIGURA 9. SEQUÊNCIA DOS GENES *KIR* EM HAPLÓTIPOS



**Figura 9.** Diagrama representativo da sequência dos genes *KIR* em haplótipos. A organização haplotípica do haplogrupo A e dois haplogrupos B foram realizados por sequenciamento genômico completo. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html#references>. Acesso em janeiro de 2009.

FIGURA 10. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DO GRUPO B



**Figura 10.** Diversidade haplotípica do grupo B. A estrutura dos haplogrupos B mostrada nesta figura foi identificada por pelo menos dois estudos de análise de segregação em famílias, seqüenciamento genômico e análise da ordem de genes. Os blocos em roxo indicam os genes de moldura, os blocos em amarelo pseudogenes (*KIR3DP1* também é um gene de moldura), blocos em azul indicam *KIR* inibidores e blocos em rosa indicam genes *KIR* ativadores.

A expressão de algumas variantes alélicas de genes *KIR* (FIGURA 11) é afetada por defeitos genéticos intrínsecos, resultando em sua não transcrição; este é o caso dos pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* e alguns alelos do gene *KIR2DL5* (VILCHES et al., 2000). Além disso, alguns genes *KIR* estruturalmente intactos são transcritos, mas expressos em níveis reduzidos na superfície de células *NK* por razões que ainda permanecem desconhecidas, como acontece com *KIR3DL3* (LONG et al., 2001). Em adição a isto, recentes descobertas têm demonstrado que alguns polimorfismos em aminoácidos de determinadas proteínas *KIR* levam à retenção citoplasmática ou à formação de variantes

solúveis como foi demonstrado para as proteínas *KIR3DL1\*004* e *KIR2DS4\*003* respectivamente. *KIR3DL1\*004* não é expresso na superfície das células *Natural Killer* devido à substituição de um aminoácido que interrompe a dobradura apropriada para o domínio D0 (PANDO et al., 2003). As proteínas *KIR2DS4\*003* são transcritas, mas não expressas na superfície devido a uma deleção de 22 pb no éxon 5 após o domínio D2. A ausência de domínio citoplasmático e transmembrana unido a uma alta frequência deste alelo nas populações humanas sugerem a possibilidade desta proteína *KIR* ser secretada pelas células *NK* (MAXWEL et al., 2002).

FIGURA 11. VARIAÇÕES ALÉICAS DOS HAPLÓTIPOS *KIR*

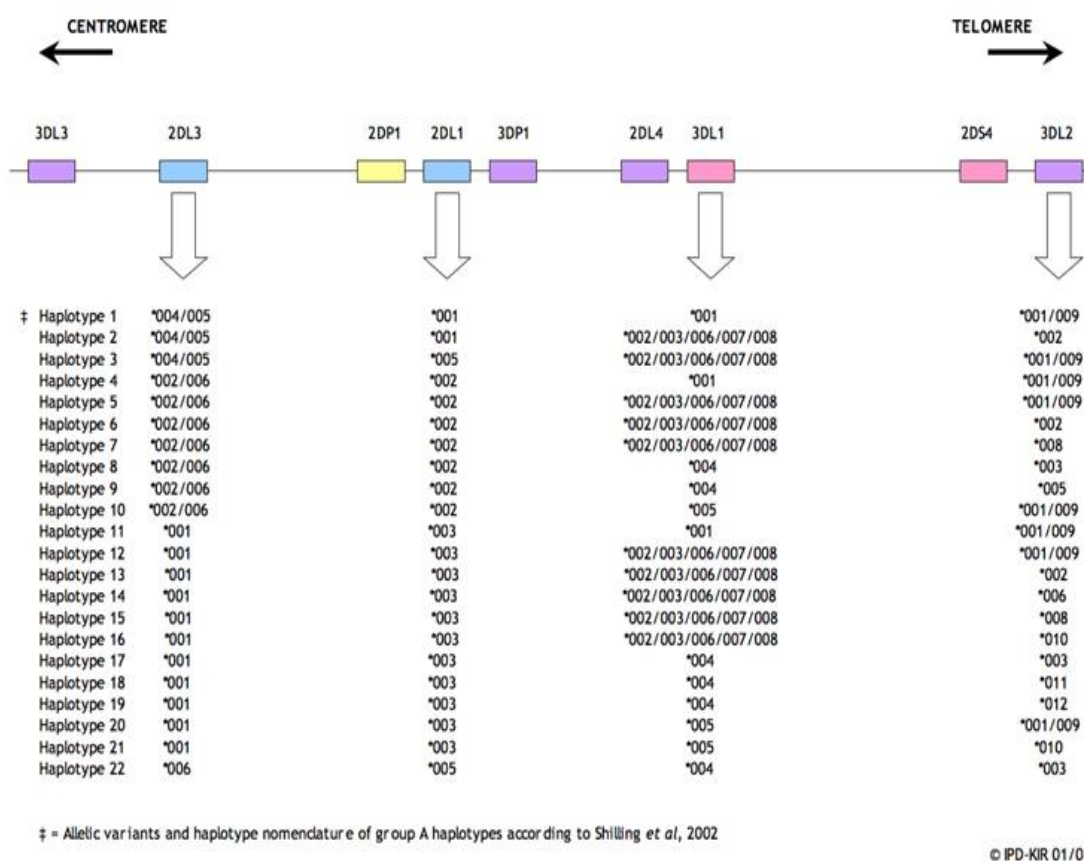


FIGURA 11. Variações alélicas dos haplótipos *KIR*. As associações alélicas observadas no haplogrupo A foram obtidos de estudos de análise de segregação em famílias. Esta figura ilustra o impacto de variações alélicas na diversidade do haplogrupo A.

## 2.10. PROTEÍNAS *KIR*

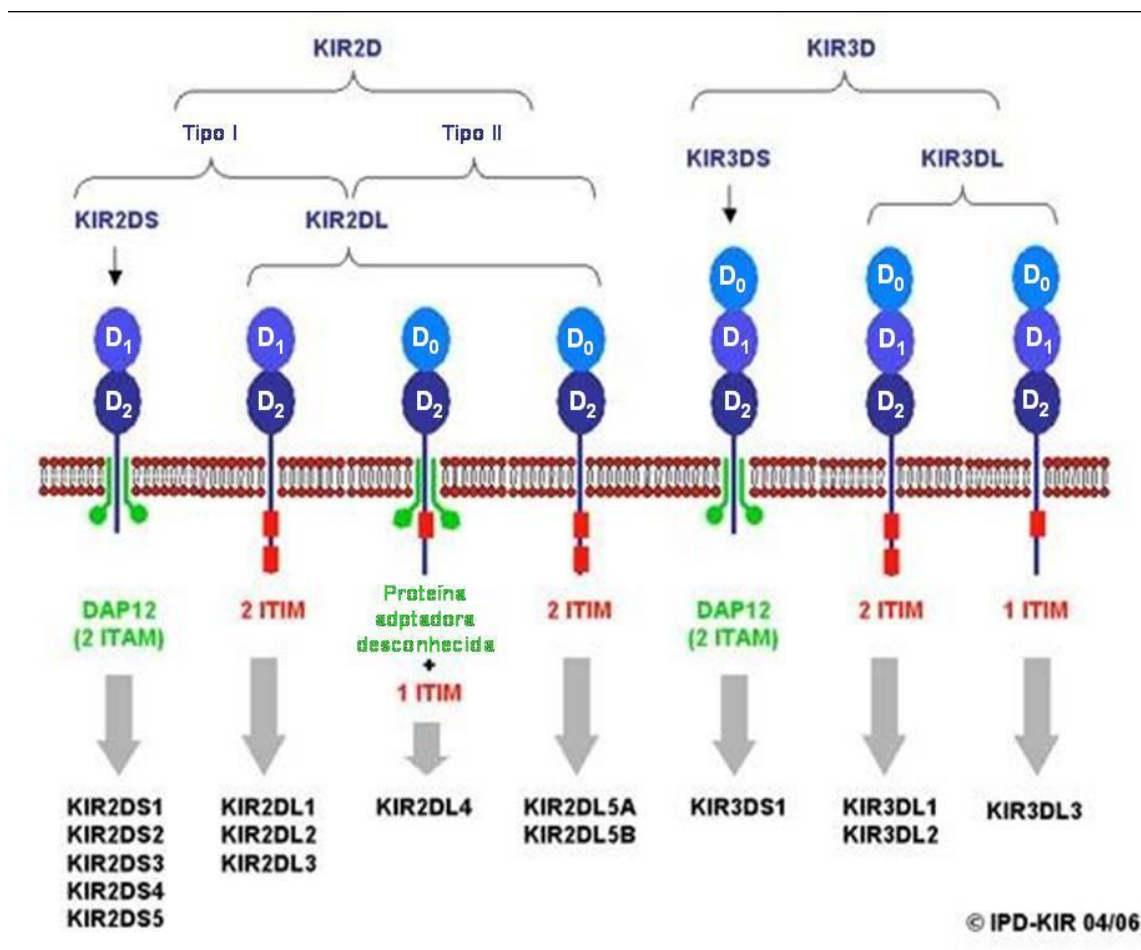
Os receptores *KIR* são membros de um grupo de moléculas reguladoras encontradas na superfície das células *NK* e foram primeiramente identificados por sua habilidade em conferir alguma especificidade na citólise mediada por estas células (HAREL-BELLAN et al., 1986; MORETTA et al., 1990). Esta especificidade se dá através da interação de isotipos de moléculas *KIR* com moléculas HLA de classe I, protegendo as células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células *NK*. Entretanto, outros isotipos *KIR* podem estimular esta atividade lítica (CARRINGTON & NORMAN, 2003). Análises de clones *NK* revelaram que células de clones diferentes expressam diferentes grupos *KIRs* inibidores ou ativadores, sendo que cada clone expressa pelo menos um receptor inibidor (MINGARI et al., 1995; MORETTA et al., 2003; VIVIER & ANFOSSI, 2004).

As proteínas *KIR* são membros da super-família das imunoglobulinas (Ig) e se estruturam em dois ou três domínios extracelulares semelhantes à Ig (D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>). As moléculas com caudas citoplasmáticas longas são do tipo inibidor (inibem a ação citolítica da célula *Natural Killer*), em virtude da presença em sua cauda citoplasmática de Imunoreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina (ITIM) responsáveis pela transdução de sinais para inibição de funções efetoras (FIGURA 12). Já as moléculas com cauda citoplasmática curta possuem uma alteração em um resíduo de aminoácido (lisina) localizado na região transmembrânica. Esta alteração, causada por mutações que afetam os receptores inibidores, pode ser suficiente para introduzir outro aminoácido com polaridade diferente que resulte em versões ativadoras capazes de ligar o peptídeo de sinalização DAP12 (Proteína de Ativação de 12 kD DNAX - *DNAX activation protein of 12 kD*). (CARRINGTON & NORMAN, 2003; MORETTA & MORETTA, 2004). A molécula *KIR2DL4* contém seqüências de ambos receptores ativadores e inibidores (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

As proteínas *KIR* variam de 306 a 456 resíduos de aminoácidos de comprimento, e o peptídeo líder da maioria dessas proteínas possui aproximadamente 21 resíduos de aminoácido. Contudo, a presença de um códon iniciador diferente no receptor *KIR2DL4* gera um peptídeo líder mais longo (SELVAKUMAR, et al., 1996).



FIGURA 12. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES *KIR* DAS CÉLULAS NK.



**Figura 12.** Estrutura das proteínas *KIR*. Características estruturais das proteínas *KIR* com 2 (*KIR2D*) ou 3 (*KIR3D*) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos *KIRs* ativadores com as proteínas adaptadoras é mostrada em verde, enquanto que os ITIMs dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: janeiro 2009.

### 2.10.1. Interações entre receptores *KIR* e seus ligantes *HLA-Cw*.

Os ligantes conhecidos para os receptores *KIRs* são todas moléculas pertencentes ao MHC de classe I. Os determinantes HLA que ligam-se aos *KIR* inibidores são conhecidos como epítomos *KIR*. Em especial, os alótipos *HLA-Cw* podem apresentar o epítomo C1, compartilhado pelos alelos *HLA-Cw* que codificam Ser77Asn80, tais como, *HLA-Cw1*, *HLA-Cw3*, *HLA-Cw7*, *HLA-Cw8*, *HLA-Cw12*, *HLA-Cw13*, *HLA-Cw14* e *HLA-Cw16* reconhecidos pelos receptores *KIR* inibidores *KIR2DL2/KIR2DL3*. Alternativamente o epítomo C2, compartilhado pelos alelos *HLA-Cw2*, *HLA-Cw4*, *HLA-Cw5*, *HLA-Cw6*, *HLA-Cw15*, *HLA-Cw\*1602*, *HLA-Cw17* e *HLA-Cw18*, que codificam Asn77Lys80, são os ligantes para *KIR2DL1*. As relações entre as moléculas *HLA-Cw* e os receptores *KIR* inibidores e ativadores são apresentadas na tabela 3.

TABELA 3. RECEPTORES *KIR* E SEUS LIGANTES *HLA-Cw*

Epítomos HLA-Cw		Receptores <i>KIR</i>	
		INIBIDORES	ATIVADORES
ASN77 e LYS80	Cw2	2DL1	2DS1
	Cw4		
	Cw5		
	Cw6		
	Cw15		
	Cw1602		
	Cw17		
	Cw18		
SER77 e ASN80	Cw1	2DL2	2DS2
	Cw3		
	Cw7		
	Cw8	2DL3	
	Cw12		
	Cw13		
	Cw14		
	Cw16		

**Tabela 3.** Relações entre receptores *KIR* e seus ligantes *HLA-Cw*. Os epítomos *HLA-Cw* estão reunidos em dois grupos distintos: Grupo 2 ou Alotipos C2= a molécula *HLA-Cw* possui o aminoácido lisina na posição 80 (LYS-80) e Grupo 1 ou Alotipos C1= onde a molécula possui o aminoácido asparagina na mesma posição (ASN-80).

Se os indivíduos forem molecularmente tipados para o locus *HLA-Cw*, faz-se necessária a conversão destes dados moleculares em dados sorológicos onde se pode prever a estrutura da proteína, a fim de se estabelecer a qual grupo



(C1;G1 ou C2;G2) o indivíduo é pertencente. Tais conversões podem ser estabelecidas a partir da tabela 4.

TABELA 4. CONVERSÃO SOROLÓGICA DAS TIPAGENS MOLECULARES DE *HLA-Cw*.

<i>HLA-Cw</i>	
Molecular (DNA)	Sorologia (Proteína)
Cw*01	Cw1
Cw*02	Cw2
Cw*03	Cw9(w3), Cw10(w3)
Cw*04	Cw4
Cw*05	Cw5
Cw*06	Cw6
Cw*07	Cw7
Cw*08	Cw8
Cw*12	indef
Cw*14	Cw1/indef
Cw*15	indef
Cw*16	indef
Cw*17	Cw7/indef
Cw*18	Cw6/indef

**Tabela 4.** Nem todos os dados moleculares possuem dados sorológicos, sendo assim identificados por “indef”.

A tabela 5 apresenta as principais características dos receptores *KIR* e seus ligantes (quando conhecidos).

TABELA 5. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES *KIR*.

KIR	Região extracelular (domínios Ig)	Aminoácido carregado em domínio transmembrânico	Nº de aác. no domínio citoplasmático; Nº de ITIMs *	Ligantes conhecidos	Função
3DL1	D <sub>0</sub> -D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	—	84; 2	HLA-Bw4	Inibitória
3DL2	D <sub>0</sub> -D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	—	95; 2	HLA-A3, outros?	Inibitória
3DS1	D <sub>0</sub> -D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	Lys	22 ou 27; 0	?	Ativadora
2DL1	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	—	84; 2	HLA-C com Lys80	Inibitória
2DL2,3	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	—	84 ou 76; 2	HLA-C com Asn80	Inibitória
2DS1	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	Lys	39; 0	HLA-C com Lys80	Ativadora
2DS2	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	Lys	39; 0	HLA-C com Asn80	Ativadora
2DS3,5	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	Lys	39; 0	?	Ativadora
2DS4	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	Lys	39; 0	HLA-C	Ativadora
2DL4	D <sub>0</sub> -D <sub>2</sub>	Arg	115; 1 ou 11; 0	HLA-G	Inibitória/Ativadora
2DL5	D <sub>0</sub> -D <sub>2</sub>	—	115; 2	?	Inibitória

**Tabela 5.** \* ITIM (motivos inibidores baseados em tirosina); aác = aminoácidos.

FONTE: Modificado de: VILCHES, C.; PARHAM, P. *KIR*: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p.217-251, 2002.

## 2.11.CONTROLE DE EXPRESSÃO

O repertório de receptores *KIR* é geneticamente variável devido a diferenças no número de locos *KIR* presente em diferentes indivíduos (VILCHES et al., 2002). O fator que contribui para expressão diferencial de receptores *KIR* específicos para cada clone de células *NK*, resulta da expressão de genes *KIR* específicos em cada um desses clones com conseqüente manutenção dos receptores *KIR* na membrana das células *NK*. Embora exista essa diversificação de expressão de genes *KIR*, suas regiões reguladoras são bastante conservadas.

Mecanismos epigenéticos têm sido especulados como responsáveis para o estabelecimento e a manutenção de diferentes padrões de expressão dos genes *KIR*. Um mecanismo importante associado à regulação de genes é a metilação de citosinas nos dinucleotídeos CpG (ilhas CpG), resultando na inibição da transcrição. A metilação do DNA é mantida durante as divisões celulares seguintes, o que fornece a capacidade de diversificar a expressão gênica de células individuais e transmiti-la para sua progênie (MORETTA & MORETTA, 2004). SANTOURLIDIS e colaboradores (2002) identificaram uma ilha CpG anterior à região dos genes *KIR*, a qual possui estrutura similar em todos os genes *KIR* expressos, com exceção do *KIR2DL4* onde a densidade de dinucleotídeos CpG é baixa. As ilhas CpG altamente metiladas correspondem a *KIRs* não expressos, pois os genes que são expressos não são metilados (SANTOURLIDIS et al., 2002).

## 2.12. GENES *KIR* E TRANSPLANTE

A atividade das células *NK*, entre outros fatores, resulta de um balanço da interação entre receptores *KIR* de superfície ativadores e inibidores, e ligantes presentes nas moléculas HLA de classe I, como por exemplo, *HLA-Cw* (LANIER, 2001).

Os receptores *KIR* se constituem no grupo de moléculas receptoras melhor caracterizadas das células *NK*. Aloenxertos expressando moléculas HLA de classe I *KIR*-Ligante incompatíveis podem ser potencialmente reconhecidos e lisados. A rejeição de aloenxertos pode ser desencadeada quando moléculas *HLA-Cw*, ligantes dos receptores *KIR* correspondentes não estão presentes. A incompatibilidade *KIR*-Ligante foi definida como a ausência de moléculas *HLA* de classe I no tecido do doador, os quais são os ligantes para as proteínas *KIRs* inibidoras presentes nas células *NK* do paciente (*3DL1*, *2DL2/3*, *2DL1* e *3DL2*). Estudos indicam a ocorrência de aloreações mediadas pelo repertório *KIR*, quando o alvo alogênico não expressa moléculas HLA de classe I que são os ligantes específicos da ação citolítica das células *NK* (RUGGERI et al., 2004). O conhecimento atual das especificidades *KIR* ativadoras ou inibidoras da lise celular através da ligação com epítomos presentes nas moléculas HLA, ainda é incompleto, embora existam alguns exemplos conhecidos de especificidade entre o receptor *KIR* e a molécula HLA.

A descoberta que receptores semelhantes à Ig (*KIR*) das células *NK* interagem com epítomos geneticamente polimórficos em moléculas HLA classe I, e que o repertório próprio de receptores *KIR* é geneticamente variável, levou à investigação da relevância do sistema *KIR* para transplante de células tronco hematopoiéticas. Inúmeros estudos retrospectivos de transplantes têm demonstrado efeitos benéficos ou deletérios de incompatibilidades entre epítomos HLA e receptores *NK*.

A capacidade das células *NK* de exibir aloreatividade foi reconhecida por várias décadas como “híbrido resistente”, no qual as células *NK* do MHC de camundongos F1 heterozigotos rejeitaram o parental homozigoto (YU et al., 2001). A aloreatividade F1 em oposição ao tipo MHC do homozigoto parental é contrária à genética clássica de transplante mediada por células T, mas estudos recentes revelaram a base molecular para aloreatividade em murinos e células *NK* humanas (TROWSDALE, 2001).

A natureza dos receptores ativadores e seus ligantes em células alvo não é completamente entendida. A lise de células alvo prossegue então a menos que os receptores inibidores da célula *NK* acoplem seu ligante no alvo. Como comentado anteriormente os ligantes da célula alvo para os receptores inibidores são epítomos presentes nas moléculas HLA classe I, em especial *HLA-Cw*, *HLA-G* entre outros.

Os receptores inibidores de *NK* incluem a família do receptor CD94/NKG2 e a família de receptor de célula *NK* semelhante à imunoglobulina. Tanto a família do receptor CD94/NKG2 quanto seus ligantes (moléculas *HLA-E*), apresentam um polimorfismo genético conhecido limitado (BRAUD et al., 1998; TROWSDALE et al., 2001; HITAMI et al., 2003); assim há pouca possibilidade que esse sistema receptor-ligante tenha papel importante para explicar a variação no resultado de transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas.

Em contraste, o repertório de receptores *KIR* é geneticamente variável devido a diferenças no número de locos *KIR* presente em diferentes indivíduos (VILCHES et al., 2002). Os ligantes dos receptores *KIR* são geneticamente determinados pelos epítomos dos antígenos HLA classe I localizados no cromossomo 6 (VILCHES et al., 2002). Muitos indivíduos possuem *KIR* inibidores para os quais não há epítomos HLA classe I apropriados, aumentando a capacidade de ação lítica das células *NK*. Entretanto, as moléculas HLA de um indivíduo podem modificar o repertório de expressão *KIR* durante a maturação de células *NK*, impedindo surgimento de clones *NK* nos quais o único *KIR* inibidor é específico para um epítomo HLA que não está presente naquele indivíduo (VALIANTE et al., 1998). A existência de receptores inibidores de *NK* para epítomos de moléculas HLA é um possível sistema direcionado para o aloreconhecimento.

O repertório de *KIR* inibidores e suas interações com ligantes HLA têm sido freqüentemente ignorados nos critérios de seleção do doador-receptor compatível, que resumem-se a estudos da compatibilidade HLA entre ambos.(WITT, 2006).

### 2.13. FREQUENCIAS *KIR*

Estudos prévios demonstraram que os genes *KIR* estão envolvidos na patogênese de uma variedade de doenças. A associação entre os locos HLA e *KIR* é encontrada em doenças infecciosas, doenças autoimune/inflamatórias, câncer e reprodução (FIGURA 13).

Polimorfismos *KIR* podem estar associados com a susceptibilidade à infecção ou a proteção ao vírus da hepatite B. ZHI-MING e colaboradores sugerem que os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS3* são genes de susceptibilidade ao vírus, que induz uma reação inflamatória persistente embora fraca que resulta em ferimentos contínuos dos tecidos vivos e a hepatite crônica. Por outro lado, os genes *KIR2DS1*, *KIR3DS1* e *KIR2DL5* podem ser genes protetores ao vírus da hepatite C (ZHI-MING et al., 2007).

Até o momento, relatos indicam que as combinações *KIR*-HLA com potencial forte de ativação são protetoras ao HIV, sendo os locos *KIR3DL1/KIR3DS1* os locos considerados mais importantes. O *KIR3DL1* e *KIR3DS1* segregam como alelos do mesmo locus e compartilham aproximadamente 97% de similaridade da seqüência do seu domínio extracelular, sugerindo que possam ter ligantes similares. As moléculas HLA-Bw4 são ligantes para *KIR3DL1*, particularmente *HLA-Bw4-80I* (CELLA et al., 1994; CARR et al., 2005; GUMPERZ et al., 1997). Observou-se que os indivíduos contaminados com HIV, a combinação *KIR3DS1* com seu ligante *HLA-Bw4-80I* esteve associada com a progressão mais lenta da AIDS, menor carga viral média, e proteção contra infecções oportunistas (MARTIN et al., 2002; QI et al., 2006). Subseqüentemente, ALTER e colaboradores demonstraram que células *NK* que expressam fortemente e significativamente *KIR3DS1* inibiam a replicação do HIV-1 em células que expressam *HLA-Bw4-80I* em comparação às células *NK* que não expressavam *KIR3DS1*, fornecendo o primeiro suporte funcional para a influência de *KIR3DL1/KIR3DS1* e *HLA-Bw4-80I* na atividade anti-HIV de células *NK* (ALTER et al., 2007).

Ao longo das linhas observadas para o HIV, genótipos *KIR* e HLA de classe I com perfil relativamente ativador foram implicados igualmente no resultado à infecção ao vírus da hepatite C. Dados precedentes sugerem que *KIR2DL1/HLA-C2* conferem respostas inibidoras mais fortes do que *KIR2DL3/HLA-C1* (WINTER et al., 1998, AHLENSTIEL et al., 2008). Em indivíduos contaminados com

inoculação viral de baixo-dose, a combinação genotípica *KIR2DL3/HLA-C1*, que conduz teoricamente a sinais inibidores mais fracos e, conseqüentemente a um potencial mais baixo da ativação, foi protetora em termos de proteção espontânea ao vírus (KHAKOO et al., 2004). Outro estudo igualmente implicou em um papel para *KIR2DL3* na proteção ao vírus da hepatite C (ROMERO et.al., 2008).

Estes resultados fornecem evidências diretas para níveis diferenciais de inibição associados com a presença do genótipo *KIR2DL3/HLA-C1* em comparação ao *KIR2DL1/HLA-C2* e o significado funcional de tal diferença em resposta à infecção viral.

As células *NK* são importantes em infecções ao vírus da herpes, uma vez que indivíduos deficientes em células *NK* são particularmente mais suscetíveis a estas infecções (BIRON et al., 1989). O citomegalovírus codifica diversas proteínas que interferem na expressão de moléculas MHC de classe I (LIN et al., 2007), potencialmente tornando células contaminadas mais suscetíveis ao ataque por células *NK*. Um estudo de um caso de uma criança com uma nova síndrome de imunodeficiência e recorrente infecção ao citomegalovírus (GAZIT et al., 2004), demonstrou que toda a população de células *NK* deste paciente expressava *KIR2DL1* e a criança igualmente possuía o ligante para o *KIR2DL1*, *HLA-C2*, levantando a possibilidade que a forte inibição da combinação *KIR2DL1/HLA-C2* incapacitou a atividade das células *NK* e impediam as células de montarem uma resposta protetora ao citomegalovírus. Assim, como em outras infecções virais, a ativação de células *NK* parece ser protetora a infecção ao citomegalovírus.

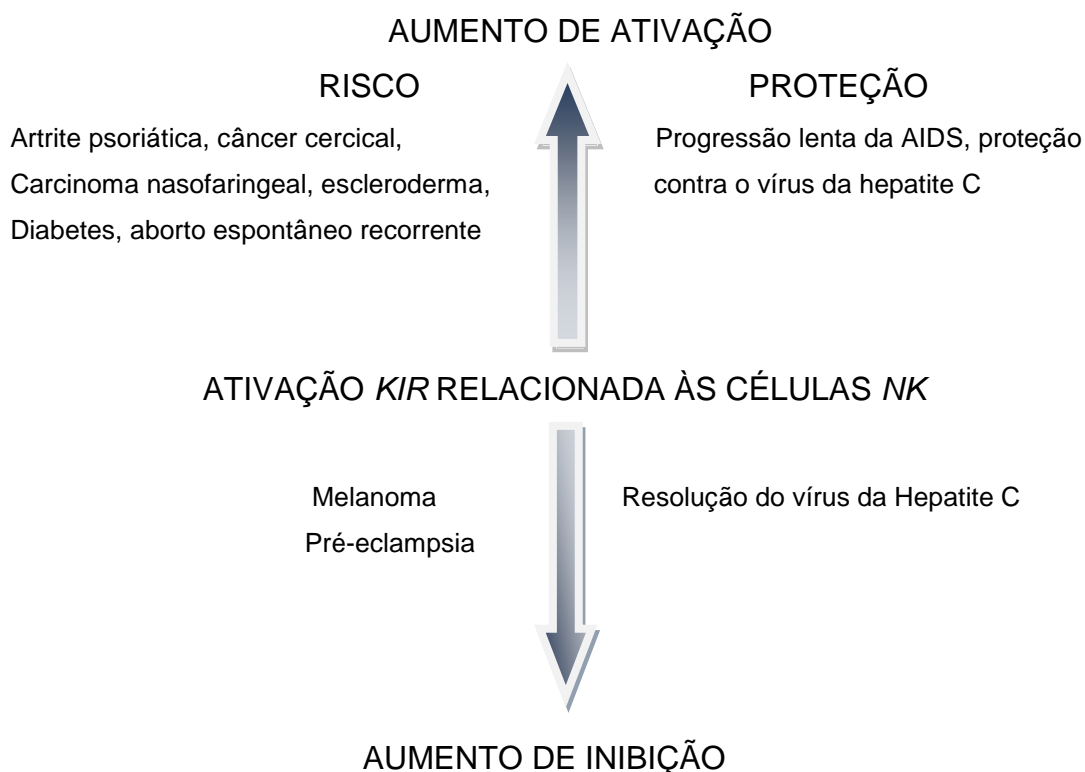
*Mycobacterium tuberculosis* é altamente endêmico em algumas partes do mundo. Em um estudo recente, MENDEZ e colaboradores encontraram uma freqüência significativamente mais elevada de *KIR2DL1* e de *KIR2DL3* nos pacientes, embora após a correção de múltiplas comparações, apenas o *KIR2DL3* permaneceu fracamente significativo (MENDEZ et al., 2006).

Os haplótipos B são caracterizados por um número maior de ativadores (SUZUKI et al.; 2004), entretanto, apenas o *KIR2DS1* (LUSZCZEK et al., 2004) ou em combinação com *HLA-Cw6* (um ligante C2 para o *KIR2DS1*) foram associados à psoríase (HOLM et al., 2005). O efeito de genótipos compostos de *HLA* e de *KIR* na artrite psoriática igualmente tem sido delineado (NELSON et al., 2004). Baseado em dados, um modelo proposto dentro de um gradiente maior de ativação aos genótipos compostos mais inibidores de *KIR2D* e *HLA-C* parecem influenciar a susceptibilidade à artrite psoriática (NELSON et al., 2004). Genótipos

conferindo a mais alta ativação (*KIR2DS1* e/ou *KIR2DS2* tanto para homozigotos *HLA-C1* ou *C2*) são associados com maior susceptibilidade. Ao contrário, genótipos conferindo máxima inibição (ausência dos receptores de ativação *KIR2DS1* e *KIR2DS2* e a presença de ambos os ligantes inibidores *HLA-C1* e *C2*) eram protetoras.

Os perfis de genes *KIR* ativadores foram igualmente associados com outras condições inflamatórias. Não há dúvida que a lista continuará a crescer, com a maioria das conclusões baseadas em dados clínicos precisos e em grandes tamanhos de amostra. Como em todos os estudos epidemiológicos genéticos, a evidência funcional para a interação entre os *KIRs* com cauda curta e seus ligantes é necessária para suportar os vários modelos genéticos de predisposição a circunstâncias auto-imunes.

Uma predominância de mães com pré-eclampsia homozigotas para o haplótipo A, combinado a presença de *HLA-C2* no feto (HIBY et al., 2004) sugere que essa forte inibição de células *NK* decíduais via *KIR2DL1* e *HLA-C2* conduz à forte inibição de células *NK* uterinas, que por sua vez, danifica a remodelação de vasos sanguíneos maternos. Um balanço no nível de ativação/inibição pode ser necessário no sucesso reprodutivo onde tanto a ativação excessiva, como a inibição excessiva de células *NK* poderia ser prejudicial na manutenção da gravidez. O *KIR2DL4* é particularmente interessante por seu papel nas interações materno-fetal, pois se liga ao *HLA-G*, expresso em trofoblastos. YAN e outros mostraram que a expressão na superfície das células de *KIR2DL4* foi significativamente mais elevada em controles normais em comparação àquelas com aborto espontâneo recorrente (YAN et al., 2007).

FIGURA 13. *KIR* mediando ativação/inibição de células *NK* em doenças.

**Figura 13.** Sumário de *KIR* mediando ativação/inibição de células *NK* em doenças. Distintos pares *KIR* e ligantes HLA geram uma hierarquia de ativação de células *NK*. Ambos os aumentos de ativação e inibição estão associados com a susceptibilidade a e a proteção contra uma variedade de doenças.

Teoricamente, a ativação de células *NK* e células T podem ser reguladas por um dos dois mecanismos seguintes: a presença de sinalização através dos receptores de ativação em uma grande proporção de células efetoras (por exemplo, haplótipos *KIR* que contêm muitos receptores ativadores) ou presença da combinação receptor inibidor-ligante que emite relativamente fracos sinais inibidores. Acima da interação com moléculas HLA de classe I expressas na superfície de células alvo, os genes *KIR* fornecem sinais de ativação ou inibição para regular a ativação de células *NK* e células T. Desse modo, possuem um papel importante na imunidade antiviral e anti-tumoral (VILCHES et al., 2002).

A capacidade de células *NK* lisarem espontaneamente células tumorais e sua potente atividade citotóxica antileucêmica *in vitro* sugerem importantes funções para estas células na resposta imune antileucêmica *in vivo* (TRINCHIERI et al., 1989; LOTZOVA et al., 1987).



O transplante de células tronco hematopoiéticas alôgenico é uma terapia imune efetiva para doenças hematológicas que constituem alterações funcionais em células sangüíneas ou tecidos hematopoiéticos. Em particular para LMC, o TCTH é o único tratamento curativo até o momento. Entretanto, os dados são muito limitados e com resultados contraditórios (VAN DER MEER et al., 2008).

O sucesso de TCTH alogênico é dependente em parte de respostas antitumorais montadas por linfócitos do doador. As células *NK* têm sido identificadas como importantes mediadoras de respostas antileucêmicas após TCTH não relacionado e transplante haploidentico (GIEBEL et.al., 2003; LEUNG et al., 2004; RUGGERI et al, 2002; ELMAAGACLI et al., 2005). Recentemente, a atenção tem se direcionado no papel da incompatibilidade *KIR*-ligante na direção GvH entre doador e receptor em TCTH alogênico.

Recentemente, estudos demonstraram que células leucêmicas podem diminuir a expressão de moléculas HLA I e subseqüentemente perder o alelo (DEMANET et al., 2004; ELKINS et al., 1984; BROUWER et al., 2002; VOLLMER et al., 2003). Além disso, suportam o papel de células *NK* como protagonistas no efeito do enxerto-*versus*-leucemia em transplante alogênico (JIANG, et al, 1997; RUGGERI et al., 1999; RUGGERI et al., 1998). Estes dados demonstram que as células *NK* teriam um importante papel na imunovigilância de células leucêmicas. Em consequência do variável conteúdo de genes *KIR* em genomas individuais que regulam as funções de células *NK*, a resposta imune inata ao controle de doenças, incluindo a leucemia, pode variar entre seres humanos.

A literatura tem relatado diferenças em freqüências de genes *KIR* em pacientes com doenças hematológicas. VAN DER MEER e colaboradores, encontraram uma associação com o *KIR2DS5* é uma maior sobrevivência em leucemia após transplante HLA idêntico em pacientes com LMC (VAN DER MEER et al., 2008). Outras investigações indicam um reduzido risco de relapso em pacientes com LMC após transplante com doadores contendo incompatibilidades *KIR*. ELMAAGACLI e outros sugerem que a incompatibilidade *KIR*-ligante seja um importante fator prognóstico na ocorrência de relapso após transplante para LMC (ELMAAGACLI et al., 2005). Pacientes com incompatibilidade *KIR*-ligante na direção GvH apresentaram maiores taxas de sobrevivência comparados a pacientes sem incompatibilidade *KIR*-ligante (GIEBEL et al., 2003).

Diversas correlações significativas de *KIRs* ativadores com sobrevivência e relapso totais têm sido encontradas. Todos os dados foram combinados com características dos pacientes e doadores e dados clínicos pós- transplante. Uma sobrevivência total mais elevada foi considerada quando *KIR2DS1* no doador foi incompatível ao ligante *HLA-C2* no paciente. Indicando que o número de *KIR* ativadores tanto no paciente quanto no doador demonstra uma correlação significativa com a ocorrência de relapso (SCHELLEKENS et al., 2008).

A literatura específica tem relatado análises de populações heterogêneas de pacientes como um único grupo (COOK et al., 2004; SCHELLEKENS et al., 2008), ou seja, pacientes com doenças de bases distintas, estágios da doença variáveis e com tempos diferentes de transplante. Tanto o tipo de doença de base como a fase da doença desempenham um importante papel na aloreatividade das células *NK* (HSU et al., 2005; MILLER et al., 2007).

## 2.14. HAPLÓTIPOS *KIR*

Durante os últimos 30 anos, o TCTH de irmãos HLA compatíveis tornou-se o tratamento para muitas doenças hematológicas. Com modernas técnicas de imunossupressão, tais transplantes resultam em baixo risco relativo de doença do enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHD) fatal e sucesso no desenvolvimento da tolerância imune e reconstituição imune. Entretanto, todo o par de doador irmão tem somente uma possibilidade de 25% de herdar o mesmo haplótipo HLA de seus pais, sendo em média três irmãos por família e um é o paciente, menos de 40% dos pacientes terão tal compatibilidade.

Conseqüentemente, os registros de doadores voluntários têm sido estabelecidos para transplantes não relacionados. A chance de encontrar um doador não relacionado compatível depende da diversidade HLA e depende da etnia, em torno de 60-70% em caucasianos e abaixo de 10% para outras etnias. Outras limitações são: o tempo para identificação do doador nos registros, podendo ocasionar a progressão da doença no paciente que necessita urgentemente de um transplante, um exemplo, pacientes com leucemia aguda, idade, como um risco de morbidade e mortalidade; e compatibilidade baseada em técnicas de DNA, desde que isto reduza a probabilidade de encontrar um doador compatível. Por todas estas razões o TCTH para irmãos HLA compatíveis e doadores não relacionados não é possível para metade dos pacientes que necessitam de um transplante, por isso a atenção tem sido focada em outros recursos de células tronco.

Transplantes haplo-idênticos, de um haplótipo HLA incompatível de um membro da família têm sido utilizados como tratamento desde a década passada devido a muitos pacientes com leucemia que poderiam ter sido beneficiados com transplante hematopoiético alogênico, falharam ao encontrar um doador compatível relacionado ou não relacionado. Além disso, muitos pacientes necessitam urgentemente de um transplante enquanto aguardam por um doador não relacionado. Entretanto, aproximadamente todos os pacientes possuem um membro na família, que é idêntico para um haplótipo HLA e totalmente incompatível para o outro e, pode imediatamente servir como doador.

Nos transplantes haplo-idênticos, outro tipo de aloreatividade, mediada pelas células *NK* é ocasionado por '*mismatches*' entre os receptores *KIR* de células *NK* do doador e moléculas HLA de classe I nas células do receptor, a conhecida aloreatividade doador-*versus*-receptor. Influenciando o resultado de

TCTH de uma maneira surpreendentemente favorável (RUGGERI et al., 2007). Em uma série limitada de transplantes haploidênticos, 57 pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) (HSU et al., 2006), que foram transplantados de doadores *NK* alorreativos, observou-se que a alorreatividade de *NK* doador-*versus*-receptor reduziu o risco de relapso da leucemia, não causou GvHD, e houve melhora na sobrevivência (RUGGERI et al., 2002).

Embora os genes *KIR* e HLA sejam herdados independentemente, a maioria dos indivíduos possuem um complemento total de genes *KIR* para receptores inibidores para os três principais ligantes HLA de classe I (alelos *HLA-C* do grupo 1 e 2 e alelos *HLA-Bw4*) (UHRBERG et al., 1997). Em 162 indivíduos selecionados para genotipagem *KIR*, 97% foram positivos para o *KIR2DL1* (o receptor para alelos *HLA-C* do grupo 2), 100% expressaram receptores *KIR2DL2/KIR2DL3* (alelos específicos para *HLA-C* do grupo 1) e 94% foram positivos para o *KIR3DL1* (receptor para alelos *HLA-Bw4*) (VELARDI et al., 2003).

Em transplante hematopoiético haploidêntico com potencial para GvH mediada por reações *NK*, as células tronco enxertadas causam uma onda de células *NK* de origem do doador que regenera o mesmo repertório como do doador, e inclui assim altas freqüências de células *NK* autoreativas doador-*versus*-receptor (RUGGERI et al., 1999). A alorreatividade doador-*versus*-receptor de células *NK* reduziu drasticamente o risco de relapso de leucemia em 57 pacientes com LMA com alto risco de relapso ao melhorar o transplante e ao proteger contra GvHD (RUGGERI et al., 2002; FARAG et al., 2002; VELARDI et al., 2002).

Evidências experimentais têm confirmado que as células *NK* estão diretamente envolvidas no controle do relapso em LMA. Estudos *in vitro* demonstraram que 100% de leucemias mielóides foram mortas por células *NK* alorreativas, mas apenas uma pequena fração de fenótipo comum de leucemia linfóide aguda foram lisadas (RUGGERI et al., 1999). Além disso, estudos sugerem que as células *NK* atacam predominantemente as células hematopoiéticas do hospedeiro, mas não outros tecidos que são alvos comuns para células T mediando a doença do enxerto-*versus*-hospedeiro (GvH). Alorreatividade de células *NK* em murinos, não causa GvHD em ratos, mesmo quando recebem uma infusão em larga escala (RUGGERI et al., 2002). Em contraste, no mesmo modelo, células T alogênicas matam os ratos em duas semanas. Interessantemente, as células *NK* alorreativas matam as células

dendríticas do tipo hospedeiro, que impede a apresentação de antígenos do doador para células T transplantadas, um passo crucial para iniciar as reações GvH (SHLOMCHIK et al., 1999; MCKALL et al., 2004). A aloreatividade de *NK* erradica a leucemia, favorece o transplante pela morte de células linfopoiéticas do hospedeiro e reduz GvHD pela eliminação de células dendríticas do tipo hospedeiro. Uma consequência destes resultados é a necessidade de explorar estes resultados rapidamente revisando critérios atuais para seleção de doador haploidêmico. A seleção de doador para LMA envolve a procura por um doador capaz de montar aloreatividade de *NK* doador-versus-receptor (KÄRRE, 2002).

A procura por doadores *NK* aloreativos pode exigir a extensão da família para outros membros tais como tios e primos. Uma busca estendida aumenta a possibilidade de encontrar um doador *NK* aloreativo de aleatórios 30% para > 60% (que é próximo ao máximo, sabendo que o tipo HLA de aproximadamente 30% da população é resistente à morte por células *NK* aloreativas).

Os genes *KIR* variam de um indivíduo para outro, e a extensão da diversidade *KIR* humana concorre com os genes HLA (UHRBERG et al., 1997). Três componentes contribuem para diversidade: os haplótipos *KIR* diferem no conteúdo dos genes; os genes *KIR* são polimórficos; e os haplótipos *KIR* associam-se aleatoriamente para formar os genótipos *KIR*. Consequentemente, indivíduos não relacionados raramente possuem genótipos *KIR* idênticos e a maioria dos transplantes de células hematopoiéticas envolve doadores e receptores com genótipos *KIR* diferentes (SHILLING et al., 2003). Apesar da complexidade, os haplótipos *KIR* dividem-se simplesmente em dois grupos funcionais distintivos (UHRBERG et al., 1997), grupo A e grupo B.

Comparações de genes *KIR* através dos primatas indicaram rápida evolução desta família de receptores (KHAKOO e CARRINGTON, 2006; KHAKOO et al., 2000; VILCHES e PARHAM, 2002), e dados recentes demonstraram que os locos *KIR* e HLA realmente estão coevoluindo (NORMAN et al., 2007; SINGLE et al., 2007). Os genes *KIR* demonstram alta similaridade na sequência que pode facilitar a ocorrência de recombinação homóloga não-alélica (CARRINGTON e CULLEN, 2004; LUPSKI, 1998) e explicar em alguma extensão a expansão e contração dos haplótipos *KIR* (MARTIN et al., 2000; WILSON et al., 2000). A elasticidade dos locos *KIR* resulta da geração de haplótipos *KIR* que podem ter duas ou mais cópias do mesmo gene em um único haplótipo, uma

ordem rearranjada dos genes ou genes híbridos novos (GOMEZ-LOREZANO et al., 2005; MARTIN et al., 2003; WILLAMS et al., 2003).

Populações humanas podem notavelmente variar nos haplótipos e frequências de genes *KIR*, possivelmente um reflexo da pressão de seleção conferida por doenças específicas na população (COOK et al, 2003; CRUM et al., 2000; DENNIS et al.,2005; FRASSATI et al., 2006; GENDZEKHADZE et al., 2006; JIANG et al, 2005; KULKARNI et al, 2008; MIDDLETON et al., 2007; NORMAN et al., 2001; RAJALINGAM et al, 2002; TONEVA et al., 2001, VELICKOVIK et al., 2006; WHANG et al, 2005; WITT et al., 1999; YAWATA et al., 2002). Há evidências claras de seleção balanceadora no sistema *KIR* e importância biológica de ambos os haplótipos A e B para sobrevivência de populações humanas. Como demonstrou um estudo realizado em ameríndios, onde a diversidade elevada de *KIR* é mantida por poucos conteúdos de genes dos haplótipos (GENDZEKHADZE et al., 2006).

Estudos com populações caucasianas demonstraram que o haplótipo A é predominante sobre o haplótipo B, possuindo o *KIR2DS4* como único gene ativador (UHRBERG et al., 2002). A distribuição de frequência de haplótipos A e B são aproximadamente iguais em populações caucasianas, mas este balanço não é mantido em algumas populações, tais como os Aborígenes Australianos onde a frequência do haplótipo A é de apenas 13% (TONEVA et al, 2001). Atualmente, mais de 40 diferentes haplótipos B foram descritos baseados em análises de segregação (KAKHOO e CARRINGTON, 2006) e este número provavelmente aumentará à medida que mais populações forem genotipadas. Dado o papel de *KIR* em ambos os lados da resposta imune, especificidade por alotipos HLA de classe I e, sua extensiva diversidade, espera-se que a variação dos locos *KIR* influencie na resistência e susceptibilidade a inúmeras doenças humanas (KULKARNI et al.,2008). Entretanto, a diversidade de genes/haplótipos *KIR* e o forte desequilíbrio de ligação (LD) entre os pares dos locos *KIR* criam um desafio na tentativa de determinar gene(s) ou variantes alélicas que contribuam diretamente no fenótipo de doenças.

A aloreatividade de células *NK* doador-*versus*-receptor tem sido estabelecido como um elemento terapêutico chave em transplante hematopoiético haploidênticos em adulto LMA e LLA pediátrico, como um efeito benéfico possível no transplante de sangue de cordão para LMA. No presente, a aloterapia com células *NK* para leucemia é desdobrada por meio do transplante de células tronco

(e seguinte reconstituição de células *NK*) através de incompatibilidades *KIR*-ligantes. Novas pesquisas têm sido executadas para infusão células de *NK* para a imunoterapia fora do campo de transplante, aproveitando a função de células *NK* endógenas de pacientes com malignidades hematológicas (VERLARDI et al., 2009).

Os ensaios clínicos demonstraram que aloreações *NK* doador versus receptor foram altamente benéficos, reduziram o risco de relapso em leucemia, não acarretou doença do Enxerto versus Hospedeiro (GvHD) e melhorou significativamente a sobrevivência. Estas aloreações *NK* doador versus receptor ocorrem em todos os transplantes hematopoiéticos haplótipos HLA incompatíveis ("haploidênticos") que são *KIR*-ligantes incompatíveis na direção Enxerto-versus-Hospedeiro (GvH) (RUGGERI et al., 2006).

A análise de imunofluorescência pré-transplante e pós-transplante demonstraram células *NK* que expressavam *KIRs* para os quais nenhum ligante classe I estava presente no receptor. Foi detectado um potencial alorreativo doador-versus-receptor de *NK* quando os doadores eram homozigotos para os haplótipos *KIR* do grupo A, havendo, concordância entre a imunofluorescência e análises funcionais (RUGGERI et al., 2007). Em outro doador, positivo para o haplótipo *KIR* do grupo B, que, ao contrário, do grupo A, inclui maior número de *KIRs* ativadores, a imunofluorescência detectou poucas células *NK* com potenciais alorreativos do que ensaios de citotoxicidade de clones *NK*, provavelmente devido à reação cruzada de anticorpos anti-*KIR* com *KIRs* ativadores.

Assim, não obstante freqüências pós-transplante e cinética do tempo do de clones *NK* alorreativos do tipo doador e independente da incompatibilidade *KIR*-ligante, a alorreatividade *NK* do doador-versus-receptor emerge como um fator crucial na melhora dos resultados dos transplantes haploidênticos. Quando for incorporado como um critério para a seleção do doador a possibilidade aleatória de 33% de encontrar um doador *NK* alorreativo aumenta para 49%, que se aproxima do máximo, pois um terço da população expressa os três grupos de alelos classe I reconhecidos por *KIRs* que bloqueiam células *NK* de todo doador (RUGGERI et al., 2007).

Recentes estudos indicam que a combinação de haplótipos *KIR* no doador e receptor influencia no resultado de TCTH para LMA (COOLEY et al., 2009; MCQUEEN et al., 2007). Notavelmente, haplótipos *KIR* do grupo B no genótipo do

doador podem afetar o resultado do transplante para leucemia mielóide, ao contrário, de haplótipos do grupo B no genótipo do receptor podem ser benéficos em TCTH HLA compatível entre irmãos (MCQUEEN et al, 2007).

Recentemente, uma análise realizada em pacientes LMA que submeteram-se a TCTH de doadores não relacionados, demonstrou que doadores com haplótipos *KIR* conferiram benefício significativo na sobrevivência (COOLEY et al., 2009).

Perspectivas de genotipagem *KIR* em doadores, em adição a tipagem HLA deveriam ser executadas para identificar doadores HLA compatíveis com haplótipos *KIR* do grupo B.

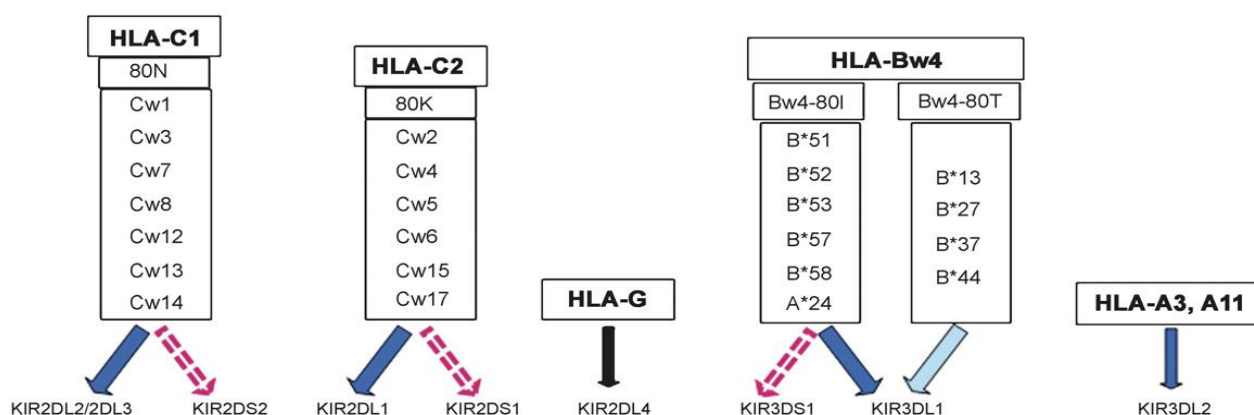
Espera-se que melhorias dramáticas obtidas pela descoberta do papel do aloreatividade *NK* estenderão o uso de transplantes haploidênticos, porque os doadores são, ao contrário, de doadores não relacionados, membros da família imediatamente disponíveis (VELARDI et al., 2008).



## 2.15.LIGANTES *KIR*

Os genes *KIR* inibidores, *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3* reconhecem ligantes *HLA-C*. Cada alótipo *HLA-C* pertence a um dos dois grupos de ligantes baseado em um dimorfismo na posição 80 da alfa hélice: grupo 1 (*HLA-C1*), possui a asparagina, e grupo 2 (*HLA-C2*), possui a lisina na posição 80 (FIGURA 14 ). A posição 44 no domínio D1 de *KIRs* parece determinar sua habilidade em discriminar entre os dois grupos de alótipos *HLA-C* (WINTER e LONG, 1997), onde *KIR2DL1* liga alótipos *HLA-C2* e *KIR2DL2/KIR2DL3* ligam alótipos *HLA-C1*. Entretanto, dados recentes, sugerem que *KIR2DL2/2DL3* possa também ligar fracamente alguns alótipos *HLA-C2 in vitro* (MOESTA et al., 2008). Os autores postularam um modelo evolucionário interessante por meio do qual as interações entre *HLA-C1* e *KIR2DL2/2DL3* existiu antes do surgimento do epítipo *HLA-C2*. O surgimento eventual do epítipo *HLA-C2* selecionado então por novas variantes *KIR* que interagiram com *HLA-C2*. A corrente de especificidades de ligação é indicativa de um sistema continuamente em evolução, onde os mais novos receptores *KIR2DL1* ligam-se exclusivamente *HLA-C2* e os mais antigos *KIR2DL2* e os *KIR2DL3* retiveram sua funcional, embora mais fraca interação com *HLA-C2*.

**FIGURA 14.** ESPECIFICIDADE *KIR*-LIGANTE HLA.



**Figura 14.** Especificidades *KIR*- ligante HLA. Alelos pertencentes aos grupos de ligantes *KIR* HLA-C1/C2 e Bw4 80I/80T são alistados nas caixas. Os receptores de ativação *KIR2DS2*, *KIR2DS1* e *KIR3DS1* exibem especificidade similares às contrapartes inibidoras correspondentes, embora suas interações sejam muito mais fracas (descrito como setas vermelhas pontilhadas). A interação de *KIR3DL1* com Bw4 80I (seta azul escura) é provavelmente mais forte do que aquela com Bw4 80T (seta azul clara). Ligantes para *KIR2DL5*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* e *KIR 3DL3* não foram identificados.

FONTE: KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Seminars in Immunology* 20: 343-352; 2008.

O *KIR3DL1* é conhecido por ligar alótipos *HLA-B* com motivo Bw4 (CELLA et al., 1994; GUMPERZ et al., 1996), embora uma baixa afinidade com Bw6 seja

igualmente relatado (CARR et al., 2005). O dimorfismo na posição 80 entre os alótipos Bw4 afeta esta interação com subtipos *KIR3DL1*, onde *HLA-B* Bw4 contendo alótipos com isoleucina na posição 80 (Bw4-80I) exibem geralmente uma inibição mais forte através de *KIR3DL1* (GUMPERZ et al., 1996; CARR et al., 2005; GUMPERZ et al., 1997). Entretanto, os alótipos Bw4 com treonina na posição 80 (Bw4-80T), tais como *HLA-B\*2705*, parecem ser melhores ligantes para determinados subtipos *3DL1* (LUQUE et al., 1996).

Outras relações receptor-ligante entre *KIR* e HLA incluem a especificidade *KIR2DL4* para *HLA-G*, que é primariamente expresso em trofoblastos fetais, células endoteliais tímicas e córnea (RAJAGOPALAN et al., 1999), e especificidade *KIR3DL2* para *HLA-A3* e *HLA-A11* (DOHRING et al., 1996). Os receptores de ativação, *KIR2DS1*, *KIR2DS2* e *KIR3DS1* compartilham similaridade de sequência em seus domínios extracelulares com suas contrapartes inibidoras correspondentes (*KIR2DL1*, *2DL2/2DL3* e *3DL1*, respectivamente) e são conhecidos por compartilhar também de especificidades obrigatórias de ligantes HLA. O *KIR2DS1* demonstrou fraca ligação aos alótipos *HLA-C2* (BIASSONI et al., 1997), sugerindo um significado funcional (STEWART et al., 2005; FOLEY et al., 2008; CHEWNING et al., 2007), e o *KIR2DS2* pode ligar-se fracamente ao *HLA-C1*, embora nenhuma conclusão seja estabelecida (STEWART et al., 2005). Até recentemente, a expressão de *KIR3DS1* era uma dúvida, mas há no momento evidências convincentes que esta forma certamente é expressa (TRUNDLEY et al., 2007; CARR et al., 2007; PASCAL et al., 2007; O'CONNOR et al., 2007). *KIR3DS1* compartilha mais de 95% de similaridade com o *KIR3DL1* em seu domínio extracelular, mas não há nenhuma evidência direta das interações entre *KIR3DS1* e alótipos Bw4. Ainda, dados genéticos epidemiológicos (MARTIN et al., 2002; QI et al., 2006), dados funcionais (ALTER et al., 2007), e dados genéticos populacionais (SINGLE et al., 2007) suportam fortemente tal interação. O *KIR2DS4* é conhecido por interagir com os alelos *HLA-Cw4* (KATZ et al., 2001) e possivelmente com um ligante não-HLA expresso em células do melanoma (KATZ, et al., 2004). Os ligantes para *KIR2DL5*, *KIR2DS5*, *KIR2DS3* ainda não foram identificados.

## 2.16. INTERAÇÕES *KIR*-HLA

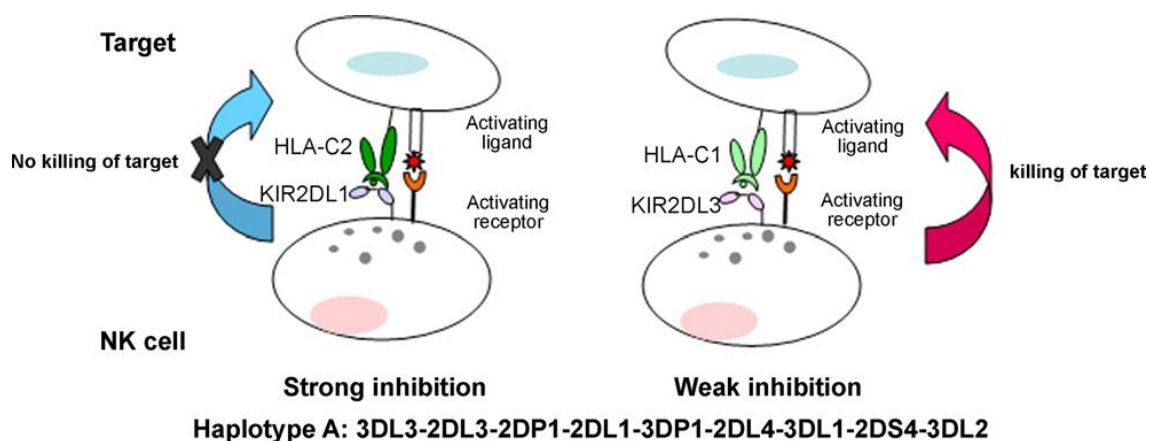
Os genes HLA de classe I e os genes *KIR* estão mapeados em cromossomos diferentes, cromossomo 6 e cromossoma 19, respectivamente. Assim, a herança e a expressão dos genes que codificam os receptores e seus ligantes são fisicamente independentes. E, como consequência é possível que um determinado *KIR*, seu ligante, ou ambos possam estar ausentes em um indivíduo, conduzindo a uma situação funcional nula. Os receptores *KIR* igualmente exibem uma expressão variegada nas células *NK*, isto é, um dado gene *KIR* é expresso em alguns, mas não em todos os clones de células *NK* dentro de um indivíduo, tal seleção combinatória adiciona outra dimensão à variabilidade e à complexidade do sistema. Uma vez adquirido, o padrão de expressão de herança dos genes *KIR* permanecem estáveis nos clones de células *NK* sob várias condições de cultura de células e estímulos de ativação (VALIANTE et al., 1997).

A expressão de *KIR* é controlada em nível transcricional por mecanismos epigenéticos, primariamente por metilação de ilhas CpG que cercam o local de início de transcrição (CHAN et al., 2005). A identificação de promotores bidirecionais para *KIR* estabelece ainda outro paralelo entre genes de receptores de células *NK* de ratos e humanos. Em humanos, os promotores bidirecionais controlam a expressão de *KIR* mudando o sentido da transcrição durante o desenvolvimento de células *NK*. Transcritos reversos são encontrados em células *NK* imaturas que não expressam *KIR*, mas estes transcritos são ausentes em células *NK* maduras que expressam *KIR*, sugerindo que a transcrição reversa bloqueie genes de ativação nas células imaturas e células precursoras de *NK* (DAVIES et.al., 2007). Assim, se o promotor para um determinado gene *KIR* é mudado para uma posição adiante durante o desenvolvimento do clone de células *NK*, então o clone maduro expressará o gene, mas se o promotor é mudado no sentido reverso, o clone não expressará o gene *KIR*. A interrupção é estocástica, resultando em uma expressão variegada de *KIR* e um repertório de subpopulações de células *NK* expressando diferentes combinações de receptores de ativação e inibição na superfície da célula que juntos são capazes de responder a uma grande variedade de estímulos.

Torna-se cada vez mais claro que a força de interações *HLA-KIR* possui um significado funcional e podem influenciar a susceptibilidade a doenças. Isto é exemplificado pelas interações entre *HLA-C* e o inibidor *KIR2D* onde *KIR2DL1/HLA-C2* (e, provavelmente *KIR2DL2/HLA-C1*) parece conferir respostas

inibidoras mais fortes do que *KIR2DL3/HLA-C1* (WINTER, et al., 1998; AHLENSTIEL, et al., 2008) (FIGURA 15). A variação alélica igualmente tem um papel na determinação da força de interação. Alguns alótipos de *KIR3DL1*, por exemplo, são expressos em altos níveis, enquanto outros são expressos em baixos níveis, correlacionando por sua vez a um nível de ligação ao *HLA-B Bw4* (GARDINER, et al., 2001; YAWATA, et al., 2006). Variantes alélicas pode igualmente diferir em termos da frequência de células *NK* que as expressam (YAWATA, et al., 2006). Os dados de associação com doenças até o momento acumulados indicam que estas diferenças são muito significativas na determinação do resultado à infecção (KHAKOO e CARRINGTON, 2006, PARHAM et.al., 2005).

**FIGURA 15. MODELO DE HIERARQUIA DE INIBIÇÃO.**



**Figura 15.** O modelo funcional para *KIR*-HLA mediando a hierarquia de inibição. A ilustração demonstra interações possíveis de *KIR*-HLA em um indivíduo homozigoto para o haplótipo A e homozigoto para *HLA-C2* (lado esquerdo) ou *HLA-C1* (lado direito), baseado nos resultados de AHLENSTIEL e colaboradores (2008). A interação de *KIR2DL1* com *HLA-C2* conduz a uma forte inibição que é difícil de superar por sinais de ativação simultâneos, e assim não há morte do alvo neste modelo. A interação mais fraca *KIR2DL3*-*HLA-C1*, de um lado, pode ser cancelado por sinais através dos receptores de ativação sobre apropriado ligante, tendo por resultado a lise do alvo.

FONTE: KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Seminars in Immunology* 20: 343-352; 2008.

As interações entre *KIR* e seus ligantes HLA podem igualmente ser afetados por peptídeos presentes no sulco de ligação da molécula HLA (MALNATI et al., 1995; RAJAGOPALAN et al., 1997; ZAPPACOSTA et.al., 1997), particularmente os resíduos nas posições 7 e 8 (BOYINGTON et al., 2000). Foi demonstrado que *KIR3DL2* liga-se ao *HLA-A3* e *HLA-A11* somente quando

específicos peptídeos do vírus Epstein-Barr é usado para dobrar os tetrâmeros HLA (HANSASUTA et al., 2004). A ligação de *KIR3DL1* a alguns alótipos *HLA-A* e *HLA-B* contendo o motivo *Bw4* foi demonstrado igualmente por ser dependente do peptídeo ligado (THANANCHAI et.al., 2007).

Enquanto a contribuição de ligantes HLA de classe I na expressão de genes *KIR* não é perfeitamente clara, existem evidências que a expressão de ligantes HLA certamente module a frequência de células *NK* que expressam receptores inibidores e seu nível da expressão (YAWATA et al, 2006).

A expressão de ligantes HLA é conhecida igualmente por ser crucial à tolerância e à instrução de células *NK*. Pelo menos um modelo suporta que cada célula *NK* tem pelo menos um receptor inibidor específico para uma molécula MHC de classe I própria que esclareceria a auto-tolerância (VALIANTE et al., 1997; RAULET et.al.,1997). Entretanto, em virtude da expressão estocástica de *KIR*, este modelo parece improvável. De fato, as células *NK* de ratos deficientes de MHC de classe I não matam seus alvos deficientes em MHC de classe I (LIAO et.al., 1991). Recentemente dois modelos têm sido propostos explicar a tolerância própria. O primeiro modelo propõe que as células *NK* que expressam pelo menos um receptor inibidor que reconheça MHC de classe I próprio, amadurecem e tornam-se funcionalmente competentes ou “licenciadas”, enquanto as células *NK* que não possuem pelo menos uma interação funcional inibidora não respondem e, conseqüentemente tornam-se “não licenciadas” (KIM et al., 2005). O outro modelo, é referido como o modelo “de desarmamento”, propõe que as células *NK* que não expressam receptores inibidores para MHC próprio são cronicamente estimuladas e, conseqüentemente se tornam anérgicas (FERNANDEZ et al., 2005). Conseqüentemente, a inibição durante a maturação de células *NK* é uma exigência crítica para que as células *NK* adquiram potencial citotóxico. Se a atividade de células *NK* é ou não regulada de maneira similar ainda não é inteiramente claro, mas dados recentes sugerem que este possa ser o caso. ANFOSSI e outros forneceram a primeira evidência de licenciamento em células *NK* humanas mostrando que as células *NK* periféricas com faltam de *KIR* inibidores para moléculas MHC de classe I próprias estejam presentes no sangue periférico humano e possuem baixa capacidade de resposta a vários estímulos (ANFOSSI et al., 2006). Os autores propõem um papel para as interações *KIR-MHC* I inibidoras na regulação da potência de células *NK* (ANFOSSI et al., 2006). KIM e colaboradores igualmente demonstraram que específicos *KIR* e alelos HLA

são associados com o nível de resposta de células *NK*, sugerindo um papel de “licenciamento” de células *NK* em seres humanos (KIM et.al., 2008).

Em TCTH HLA-incompatível, a aloreatividade ocorre quando células *NK* licenciadas de doadores que expressam receptores *KIR* inibidores para ligantes MHC de classe I do doador reconhecem a falta de ligantes MHC de classe I no receptor incompatível ("*missing-self*"). Os estudos em TCTH HLA-compatível, entretanto, igualmente demonstraram um melhor resultado em pacientes que faltavam ligantes classe I para *KIR* inibidores do doador ("*missing ligand*"), indicando que classicamente as células *NK* do doador não licenciadas expressando *KIR* para ligantes MHC de classe I não próprios podem exibir uma competência funcional em TCTH. (YU et al., 2009). Após TCTH, as células *NK* não licenciadas expressando *KIR* inibidores para MHC de classe I não-próprios exibiram *IFN-gama* intracelular e resposta citotóxica as células alvo que faltavam seus ligantes, tornando-se gradualmente tolerantes ao próprio por volta do dia 100.

Estes resultados confirmam que a aloreatividade de *NK* pode ocorrer em TCTH HLA-compatível, onde a tolerância ao próprio é adquirida pelas células tronco derivada de células *NK* após ter retirado a medula ou onde a tolerância ao próprio pode temporariamente ser superada (YU et al., 2009).

## 2.17. *KIR*-LIGANTE

O TCTH alogênico é uma terapia valiosa para leucemia agudas, leucemia com risco elevado para o relapso, síndrome mielodisplásica, e LMC. O resultado de TCTH é dependente de diversos fatores, incluindo o estágio da doença, o grau de identidade HLA entre o doador e o receptor, o regime de acondicionamento, e o desenvolvimento da GvHD. Estudos recentes apontam células *NK* aloreativas derivadas do doador como outro potente fator que influencia o resultado do transplante (RUGGERI et al., 1999; RUGGERI et al., 2002).

As células *NK* são linfócitos derivados da medula óssea que medeiam respostas imunes inatas às células infectadas por vírus e células tumorais (TRINCHIERI et al., 1989; BIRON et al., 1999). Como o primeiro subconjunto de linfócitos a reconstituir o sangue periférico após TCTH alogênico (INOUE et al., 2003; SMALL et al., 1997; SMALL et al., 1999), as células *NK* tem sido implicadas na supressão de GvHD, promovendo o enxerto da medula (RUGGERI et al., 2002; TANAKA et al., 2000; BORNHAUSER et al., 1999; ASAI et al., 1998) e de mediar o efeito enxerto-*versus* -leucemia (RUGGERI et al., 1999; RUGGERI et al., 2002; ZEIS et al., 1995; HAUCH et al., 1990). Sabe-se que as células *NK* são reguladas por diferenças quantitativas em sinais ativadores e inibidores. Os mediadores dos sinais inibidores incluem os receptores *KIRs*, conhecidos por suas especificidades diferenciais de ligantes para moléculas HLA de classe I. Acima da interação com células alvo com falta de ligantes HLA, as células *NK* que expressam *KIR* inibidores podem ter a ponto inicial para a ativação diminuído, particularmente se as células alvo expressam ligantes adicionais para receptores *NK* ativadores.

Em transplantes entre doadores e receptores HLA não idênticos observou-se que as células *NK* de doadores que encontravam células alvo do receptor faltando um alelo HLA de classe I presente no genótipo do doador mediavam efeitos anti-leucêmicos em leucemia mielóide, caso o 'mismatch' classe I direcionava-se à falta de ligante para um *KIR* do doador. Estes efeitos anti-leucêmicos incluem baixas taxas de relapso, falha do enxerto, GvHD e, finalmente uma sobrevivência total elevada (RUGGERI et al., 1999; RUGGERI et al., 2002). Considerando a incompatibilidade *KIR*-ligante do doador e receptor como base para o aloreatividade de *NK* em transplantes HLA não idênticos, diversos estudos suportam o conceito clínico de selecionar doadores para determinadas doenças

mielóides baseadas na incompatibilidade *KIR*-ligante na direção enverto-*versus*-hospedeiro (RUGGERI et al, 1999, RUGGERI et al., 2002; GIEBEL et al. 2003). Outros estudos examinaram este conceito da incompatibilidade *KIR*-ligante em transplante, entretanto, forneceram resultados conflitantes (DAVIES et al., 2002; BORNHAUSER et al., 2004; BISHARA et al., 2004; BEELEN et al., 2005).

O princípio do modelo da incompatibilidade *KIR*-ligante é que a aloreatividade das células *NK* ocorre quando o genótipo HLA do doador inclui um epítipo *KIR* que não seja parte do genótipo HLA de células alvo alogênicas. A implicação do modelo de incompatibilidade *KIR*-ligante é que as células *NK* do doador exibem *KIR* inibidores correspondentes aos ligantes HLA do doador. Sabe-se, entretanto, que os genes de *KIR*, que estão no cromossomo humano 19q13.4, e os genes de HLA, estão situados no cromossomo humano 6, segregam independente de forma Mendeliana. Isto permite duas possíveis situações, indivíduos com falta de receptores *KIR* para seus ligantes HLA e, vice-versa, indivíduos com falta de ligantes HLA para seus receptores *KIR* (DUPONT et al., 2004). Além disso, o repertório *KIR* expresso de um indivíduo parece ser regulado primeiramente pelo genótipo *KIR* e não pelo genótipo HLA (SHILLING et al., 2002; GUMPERZ, et al., 1996, FROHN et al., 1997; GARDINER et al., 2001; VILCHES et al., 2002; LEUNG et al., 2004).

Os *KIR* inibidores com ligantes HLA identificados são *KIR2DL2* e *KIR2DL3*, que reconhecem alelos *HLA-C* do grupo 1, caracterizados pelo resíduo de asparagina na posição 80 da hélice  $\alpha 1$  (*HLA-C* Asn80), o *KIR2DL1*, que reconhece alelos relativos *HLA-C* do grupo 2, caracterizados por um resíduo de lisina na posição 80 (*HLA-C* Lys80), e *KIR3DL1*, que reconhece os alelos *HLA-Bw4*. Estudos populacionais de genotipagem *KIR* revelaram que há significativa diversidade *KIR* entre pessoas, tais que uns ou vários *KIR* inibidores podem faltar em um número significativo de pessoas. Adicionalmente, em uma análise do genótipo de indivíduos brancos, 4.8% dos indivíduos não expressam *KIR3DL1* e 8.4% não expressam o *KIR2DL1* (HSU et al., 2002). Similar ao HLA há diferenças significativas no genótipo *KIR* entre etnias (HSU et al., 2002; UHRBERG et al., 1997, VALIANTE et al., 1997; YAWATA et al., 2002; NORMAN et al., 2001; NORMAN et al., 2002; CRUM et al, 2000; TONEVA et al., 2001, WITT et al., 1999; RAJALINGAM et al., 2002; COOK et al., 2003; ZHANG et al., 2003).

Os estudos que investigaram a relação *KIR*-HLA e a susceptibilidade à progressão de doenças virais e à auto-imunidade reconheceram que a falta do



ligante HLA para os receptores *KIR* inibidores no paciente podem acarretar em efeitos significativos no resultado clínico da doença (NELSON et al., 2004; KHAKOO et al., 2004). Além disso, um estudo recente que examinou o genótipo *KIR* de mães e dos fetos tem demonstrado que determinadas combinações *KIR*-HLA predispõe o desenvolvimento de pré-eclampsia. (HIBY et. I, 2004). Estas análises clínicas e imunogenéticas (RUGGERI et al., 2002; GIEBEL et al., 2003; DUPONT et al., 2004; SHILLING et al., 2002; GUMPERZ et al., 1996; FROHN et al., 1997; GARDINER et al., 2001) sugerem que a aloreatividade conduzida por receptores *KIR* no transplante possa ser previsto se o genótipo *KIR* do doador for considerado além do genótipo HLA do receptor. Um estudo recente com haplótipos HLA em transplante não idênticos examinou o efeito da falta do ligante HLA no receptor para o *KIR* inibidor do doador, encontrando que esta análise pode ser somado como um caráter de previsão para o resultado do que uma aproximação da incompatibilidade *KIR*-ligante (LEUNG et al., 2004). Uma extensão lógica destes resultados é que a previsão da aloreatividade de *NK* não precisa contar com a não identidade HLA entre o doador e o receptor, como é exigido para estudos de incompatibilidade *KIR*-ligante, mas em substituição a falta de ligante no receptor, um cenário que pode ser realmente encontrado mesmo em alotransplantes HLA-idêntico (DUPONT et al., 2004).

### 3. OBJETIVOS

1. Definir e estimar as frequências da presença/ausência dos 16 genes *KIR*, dos genótipos e haplótipos *KIR* de pacientes e família nuclear; e comparar com dados observados para uma amostra da população paranaense;
2. Utilizar as 39 famílias de pacientes com doenças hematopoiéticas atendidas pelo Serviço de Transplante Alogênico do Hospital Erasto Gaertner em Curitiba para desenvolver um modelo de banco de dados que descreva as características gerais, tais como, grupo racial, sexo, idade e doença de base;
3. Desenvolver um modelo teórico utilizando um grupo de 11 pacientes com LMA para escolha de duplas doador/receptor, com base nos genótipos *KIR* de potenciais doadores no núcleo familiar e genótipos *HLA-Cw* do paciente.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Caracterizar o perfil genético de pacientes e seu núcleo familiar reúne informações relevantes que permitirão futuras investigações robustas sobre genes candidatos e sua influência em importantes doenças tais como Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Linfóide Aguda entre outras. Resultando em uma melhor caracterização genética de pacientes com doenças hematopoiéticas do Serviço de Transplante do Hospital Erasto Gaertner.

A literatura tem relatado diversos estudos demonstrando que os genes *KIR* estão envolvidos em uma variedade de doenças (YEN et al., 2001; YEN et al., 2006; MARTIN et al., 2002; VAN DER SLIK et al., 2003; KHAKOO et al., 2004). Tais estudos demonstraram associação de genes *KIR* com a suscetibilidade a doença, a resposta imune, eventos pós transplante alogênico, além de influenciar o resultado de transplante de células tronco hematopoiéticas (RUGGERI et al., 2002).

ZHAO e colaboradores investigaram genótipos *KIR* em um grupo de 54 pacientes com doenças hematológicas malignas distintas de alto risco e risco padrão e foram encontradas expressões diferentes de genes *KIR* ativadores e inibidores (ZHAO et al., 2008). Outra investigação que explorou a correlação entre polimorfismos de genes *KIR* e suscetibilidade a doença em 50 pacientes com leucemia e 60 indivíduos controle indicou que polimorfismos de genes *KIR* podem estar associados com a patogênese em chineses Hans (CHEN et al., 2007). Recentemente, o foco da investigação de genótipos *KIR* influenciando o resultado de TCTH entre irmãos HLA compatíveis sugere que com simples avaliações do genótipo *KIR* pode-se somar informações para seleção de doadores (MCQUEEN et al., 2007).

Para recomendar um transplante é necessário comparar o risco associado com a doença *versus* o procedimento do transplante que, depende do estágio da doença, da idade do paciente, do tempo de intervalo para o diagnóstico do transplante, do tipo do doador (irmãos ou doadores não relacionados), sexo do doador e características individuais (HOŁOWIECKI, 2008). Portanto, um modelo de banco de dados de pacientes com doenças hematológicas do Serviço de Transplante do Hospital Erasto Gaertner servirá como base de caracterização para estudos futuros. Possibilitando, desta forma, a comparação das informações observadas com outros Serviços de Transplantes de células Progenitoras

Hematopoiéticas no Brasil e em outros países, visando otimizar a escolha de doadores.

Recentemente, a atenção tem sido focada na incompatibilidade *KIR*-ligante na direção do enxerto-*versus*-hospedeiro (GVH) em Transplante de células tronco hematopoiéticas (DOU et al., 2008). Um melhor resultado em TCTH haploidêntico igualmente tem sido encontrado. Desde que genótipo *KIR* apresentam ampla diversidade na população, e o genótipo *KIR* do doador pode afetar o efeito da enxerto-*versus*-leucemia (GvL) em TCTH HLA-idêntico relacionado. VERHEYDEN e colaboradores sugere um efeito de genótipos *KIR* ativadores selecionados no doador possa conferir alguma proteção contra o relapso leucêmico (VERHEYDEN et al., 2005). Estabelecer um modelo para otimizar a escolha de doadores baseando-se no papel da incompatibilidade *KIR-Ligante* e, sua implementação em estudos futuros do LIGH com acompanhamento de pacientes pós-transplante é de fundamental importância uma vez que um melhor prognóstico tem se observado, podendo somar a mais um dos critérios para seleção do doador .

## 5.MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por trinta e nove pacientes com indicação de TCPH e seus familiares em primeiro grau (pais, irmãos e filhos), encaminhados pelo Serviço de Transplante do Hospital Erasto Gaertner ao Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR, no período compreendido entre julho de 2007 até maio de 2008, para realização de exames de histocompatibilidade pré-transplante.

As amostras de sangue dos receptores e de seus potenciais doadores foram coletadas no Hospital Erasto Gaertner ou no próprio LIGH, onde também foram realizadas as tipagens HLA de classe I e II. As amostras de sangue receberam um código identificador que atendia a uma ordem numérica crescente seguida do ano. A primeira família encaminhada no ano de 2006 foi nomeada 01/06. As demais famílias seguem este padrão. Dentro de cada família o paciente recebe a sigla REC (Receptor), seguido do código da família. Os demais membros do núcleo familiar recebem a siglas DRM (Doador Relacionado de Medula), seguido de uma letra do alfabeto, padrão identificador adotado para todas as famílias.

### 5.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Dois tubos com dez mililitros (10 ml) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com EDTA. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual o DNA foi extraído pela técnica de *salting-out* (JOHN et al., 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991).

### 5.3. CONCENTRAÇÃO DO DNA

A concentração de DNA das amostras foi medida pela leitura de densidade ótica, utilizando-se o espectrofotômetro Gene Quant<sup>pro</sup> RNA/DNA calculator.

#### 5.4. TIPAGEM DOS GENES *KIR* E *LOCoS HLA-Cw* PELA TÉCNICA PCR-SSOP

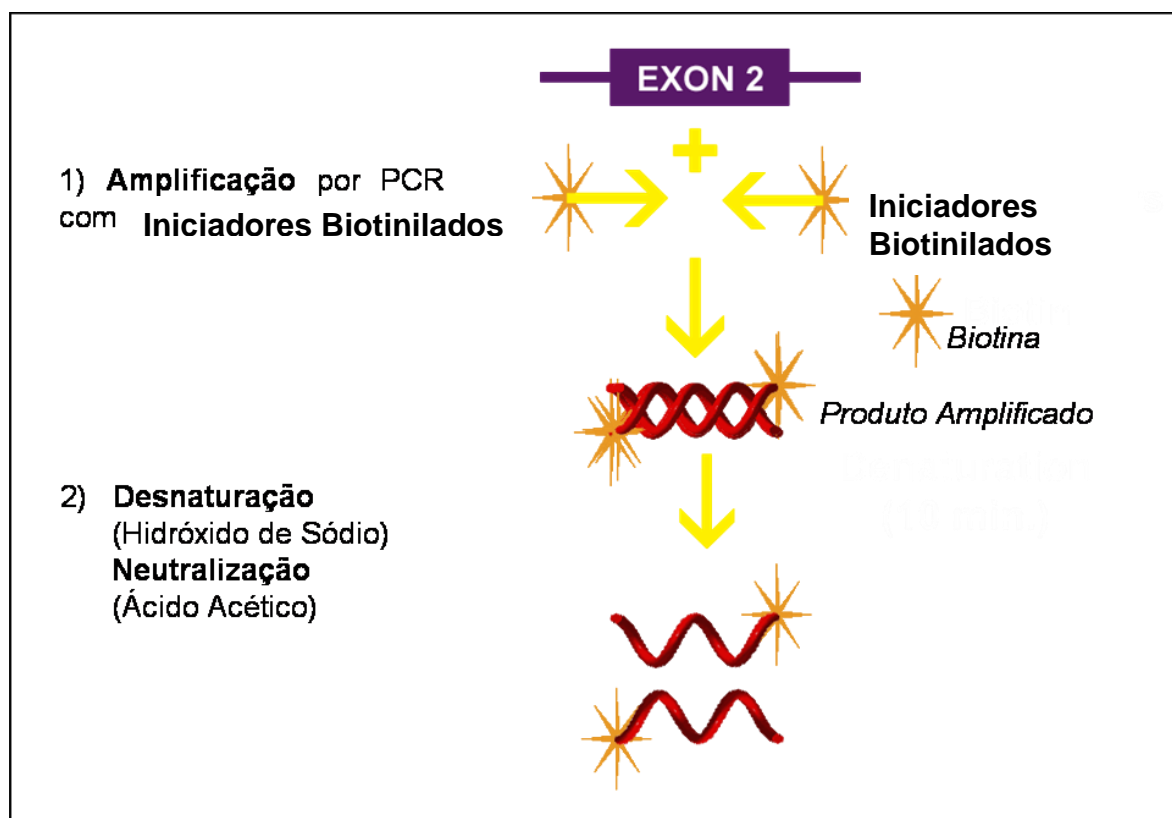
O método para tipificação dos genes *KIR* que foi utilizado no presente estudo foi de PCR-SSOP (Reação em Cadeia da Polimerase - Sondas Oligonucleotídicas Sequência Específicas/ *Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Oligonucleotide Probes*) empregando-se o “kit” *KIR SSO Genotyping Test* e o “kit” *C Locus SSO Genotyping Test* fabricado pela empresa One Lambda Inc. A amplificação do produto específico para *KIR* foi feita através de três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) específicos para os éxons 3, 5 e 7 até o 9 (7-9), presentes no “kit” para tipagem de genes *KIR* da empresa fabricante.e, a amplificação do produto específico para o *locos C*, é baseado em comparações de padrões associados com seqüências publicadas do gene HLA. Foi necessária ainda a enzima Taq DNA polimerase Platinum da empresa Invitrogen sendo que os demais reagentes da Mistura de Reação (dNTPs, tampão da enzima, cofatores da enzima) estavam presentes no “kit” de tipagem. A amplificação do segmento específico foi realizada no aparelho termociclador Perkin-Elmer 9600 e as condições de amplificação são mostradas na TABELA 6. Após a amplificação, o produto foi aplicado em gel de agarose 2,5% e corado com brometo de etídio, com a finalidade de se verificar quais amostras tiveram seus produtos amplificados e quais amostras não.

A técnica de PCR-SSOP baseia-se na desnaturação química da dupla fita de DNA do produto já amplificado com iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente), seguida por neutralização química de ambas as fitas do DNA abertas e posterior hibridização com sondas oligo-específicas. Tais sondas estão pré-conjugadas em micro-esferas (“pérolas”), sendo que cada micro-esfera possui um tipo de sonda específica para determinada seqüência de DNA. A seguir, as sondas que hibridizaram são marcadas com um produto fluorescente, a SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina - *R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin*). A leitura das micro-esferas marcadas é realizada com a ajuda de um citômetro de fluxo (LABScan<sup>TM</sup>), equipamento que através de laser na cor vermelha, comprimento de onda de 633nm, reconhece a cor da microesfera e outro laser verde, comprimento de onda 532nm, reconhece se esta microesfera está ou não marcada com SAPE, o que determinaria sua positividade (FIGURA 16a e 16b). A interpretação dos resultados é feita através do software *HLA VISUAL* Versão 2.0 (cedido pela empresa) que analisa as combinações de

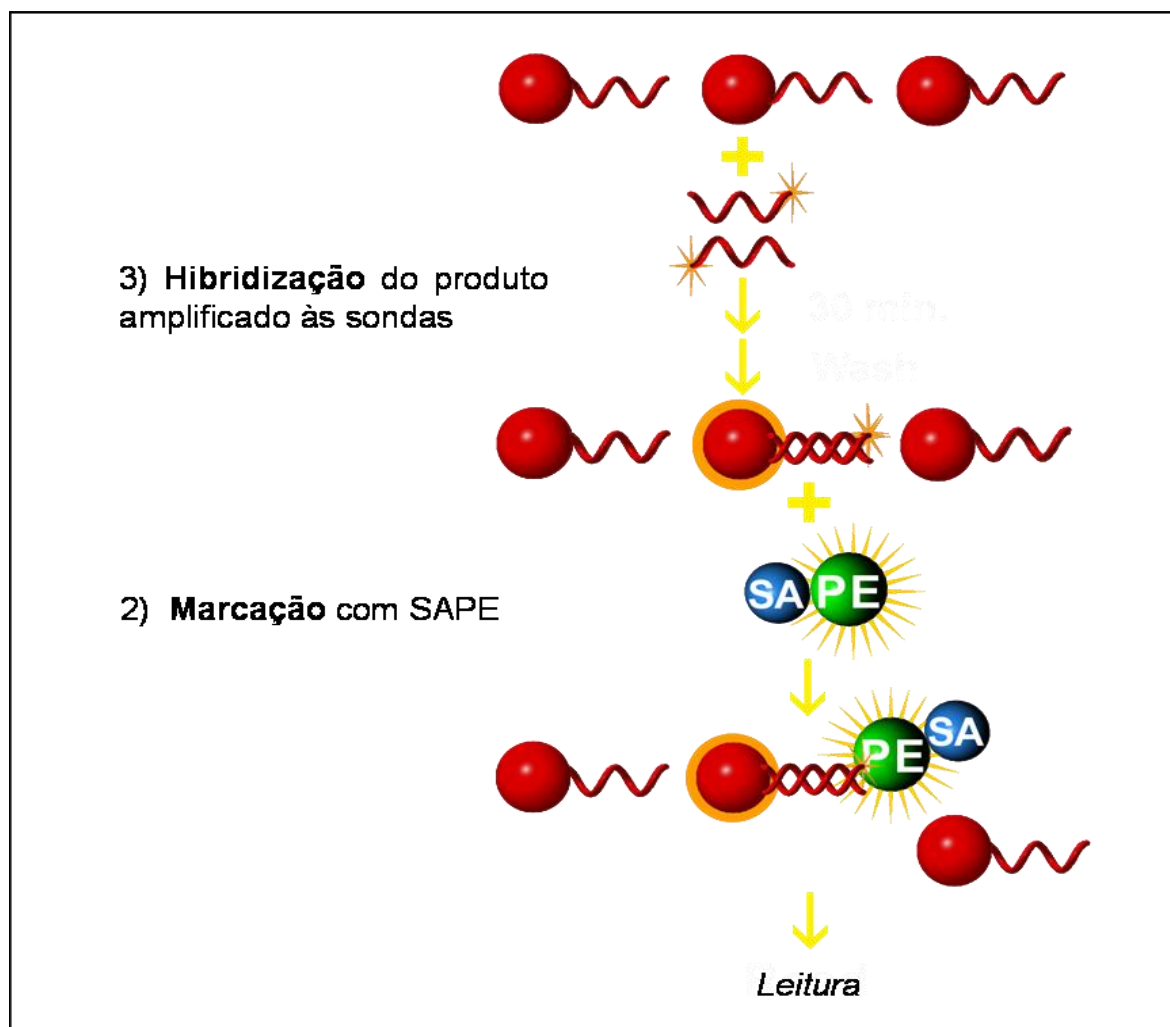
sondas nas micro-esferas detectadas pelo aparelho, o qual consulta um banco de dados interno e sugerem quais são os locos presentes. As concentrações dos reagentes não são fornecidas e os volumes foram utilizados conforme metade do recomendado pela empresa, colaborando assim para uma substancial redução dos custos de tipagem por amostra.

O *kit* e o software para realização dos testes são desenvolvidos pela empresa Norte-Americana One Lambda Inc. Todos os procedimentos para seu uso foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

FIGURA 16a. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA PCR-SSOP PARA TIPAGEM *KIR*



**Figura 16a.** Princípios da técnica de tipagem PCR-SSOP. 1) Amplificação do produto desejado com pares de iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente). 2) Desnaturação química (hidróxido de sódio) da dupla fita do produto amplificado e posterior neutralização também química (ácido acético) a fim de manter ambas as fitas separadas.



(continuação)

**Figura 16b.** Princípios da técnica de tipagem PCR-SSOP. 3) Hibridização do produto amplificado às sondas (processo dependente de elevação de temperatura) ligadas às microesferas. 4) Amplificação do sinal fluorescente pelo reagente SAPE (Estrepavidina conjugada com R-Ficoeritrina).



TABELA 6. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR  
SSOP PARA TIPAGEM DE *KIR*

TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
96 °C	3 minutos	1 ciclo
96 °C	20 segundos	5 ciclos
60 °C	20 segundos	
72 °C	20 segundos	
96 °C	10 segundos	30 ciclos
60 °C	15 segundos	
72 °C	20 segundos	
72 °C	10 minutos	1 ciclo
4 °C	∞	1 ciclo

## 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição da estrutura familiar dos pacientes, assim como o grupo racial, sexo, idade e doença de base foram obtidas por contagem direta.

A frequência da presença de cada um dos 16 genes *KIR* para todas as amostras, juntamente das frequências haplotípicas, dentro do grupo de pacientes e da amostra controle, foram obtidas por contagem direta a partir de uma tabela geral de dados montada no programa Microsoft Excel.

Para calcular as frequências gênicas, primeiramente assumiu-se que as frequências observadas seguem as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Duas formas de cálculo de frequência gênica foram adotadas, sendo que para uma delas convencionou-se que a frequência de ausência do gene é igual a  $q^2$ , onde se extraindo a raiz quadrada obtém-se o valor de  $q$ , sendo  $p = 1 - q$  temos o valor de  $p$ . O erro padrão destas frequências foi calculado a partir da fórmula  $\sqrt{(pq)/2N}$ . Para os genes cuja frequência da presença não era 100%, foi possível estimar a frequência dos heterozigotos a partir de  $2pq$  (duas vezes a frequência de  $p$  vezes a frequência de  $q$ ). A frequência de  $p^2$  foi calculada levando-se em conta que a soma das frequências,  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$  é igual a 1 (ou seja, 100%). Foi também calculado o erro padrão destas frequências segundo a fórmula:  $\sqrt{(pq)/2N}$ , onde  $N$  é igual ao tamanho total da amostra utilizada.

O segundo método empregado para se calcular a frequência gênica foi através da fórmula de Bernstein, onde: frequência gênica =  $1 - \sqrt{1-f}$ , sendo  $f$  a frequência da presença do gene observada. Esta formula também assume as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Ambos os métodos coincidem num mesmo resultado.

A análise dos 16 genes *KIR* do grupo de pacientes LLA e LMA foi realizada utilizando-se tabelas de contingência (produzidas no programa Microsoft Excel), os valores do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) resultantes foram comparados, segundo ao número de graus de liberdade, à tabela do qui-quadrado. Considerou-se que os dois grupos seriam significativamente diferentes se o valor de  $p$  fosse inferior a 0,05. Os graus de liberdade, para tal análise, foram calculados segundo a fórmula:  $(n^{\circ} \text{ de linhas} - 1) \times (n^{\circ} \text{ de colunas} - 1)$ . Quando o número amostral do grupo analisado fosse muito pequeno (inferior a 10), o que pode diminuir a acurácia do teste  $\chi^2$ , convencionou-se utilizar a correção de Yates.

Possíveis diferenças entre as frequências dos 16 genes *KIR* do grupo de pacientes e do grupo controle foram analisadas a partir do teste Exato de Fisher utilizando o programa BioEstat 5.0. Adotou-se o valor de p Bilateral.

As frequências dos haplótipos A e B foram obtidas por contagem direta. As comparações entre o grupos de pacientes e grupo controle foi realizada utilizando-se o teste de contingência empregado pelo programa BioEstat 5.0.

Para verificar a compatibilidade entre os locos que codificam moléculas *KIR* (do possível doador) e seus ligantes codificados pelo gene *HLA-Cw* (do paciente), foram necessárias conversões dos dados moleculares (resultantes da tipagem molecular do gene *HLA-Cw*) em seus equivalentes sorológicos. Esses epítomos sorológicos (Cw) podem ser reunidos em dois diferentes grupos. A distinção entre os dois grupos leva em conta qual aminoácido está presente na posição 80 da proteína HLA-Cw. A posição 80 da molécula é de grande importância durante interações destas com os diferentes receptores *KIR*. O grupo G2 reúne epítomos que possuem o aminoácido lisina na posição 80 (LYS-80), e o grupo G1, o aminoácido asparagina (ASN-80).

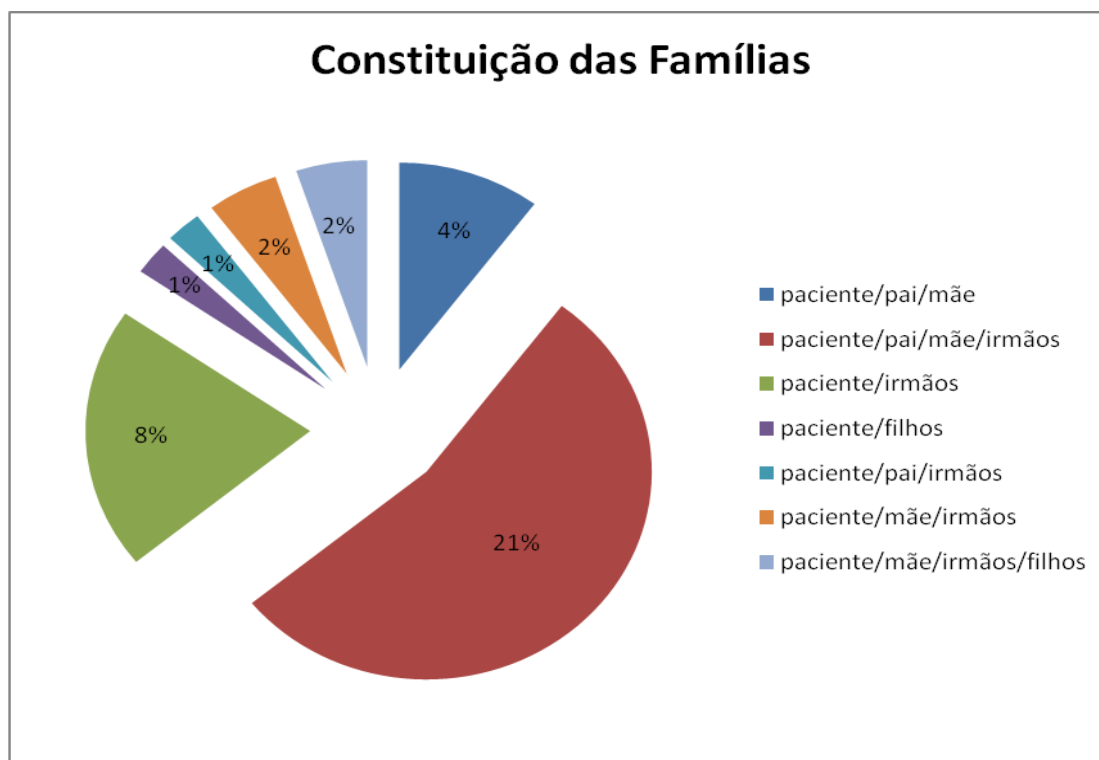
## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA

#### 6.1.1 Estrutura e composição do núcleo familiar

A amostra foi analisada considerando-se 39 famílias de pacientes com indicação de TCPH, totalizando 236 indivíduos constituintes na amostra. As famílias dos pacientes estruturavam-se em número e tipos distintos de membros. Um total de 4% (4) das famílias formava o núcleo paciente/pai/mãe, 21% (21) das famílias eram compostas por paciente/pai/mãe/irmãos, 8% (8) das famílias eram constituídas somente por pacientes/irmãos, 1% (1) das famílias era constituída por paciente/filhos, 1% (1) das famílias era constituída por paciente/pai/irmãos, 2% (2) das famílias eram constituídas por paciente/mãe/irmãos e, 2% (2) das famílias eram constituídas por paciente/mãe/irmão/filho. Esses dados estão representados no Gráfico 1.

GRÁFICO 1. Distribuição da estrutura familiar dos pacientes



**Gráfico 1.** Informações sobre a distribuição dos membros das famílias e dos pacientes foram obtidas através da ficha de entrevista feita no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética (LIGH) da UFPR.

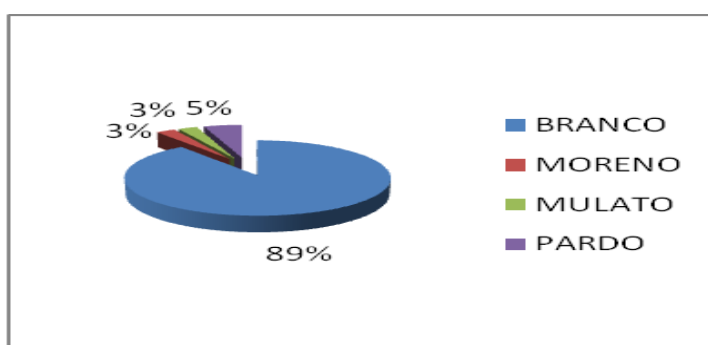
### 6.1.2 Grupo racial, sexo, idade e doença de base do paciente

As características gerais dos 39 pacientes e familiares com indicação de TCPH foram compiladas de acordo com grupo étnico/racial, sexo, idade e doença de base obtidas através de entrevista e posteriormente confirmadas nos prontuários médicos.

De acordo com a denominação do grupo racial sugerida pelo IBGE, 89% dos pacientes foram classificados como Brancos, 5% como Pardos, 3% como Morenos e 3% como Mulatos, (GRÁFICO 2).

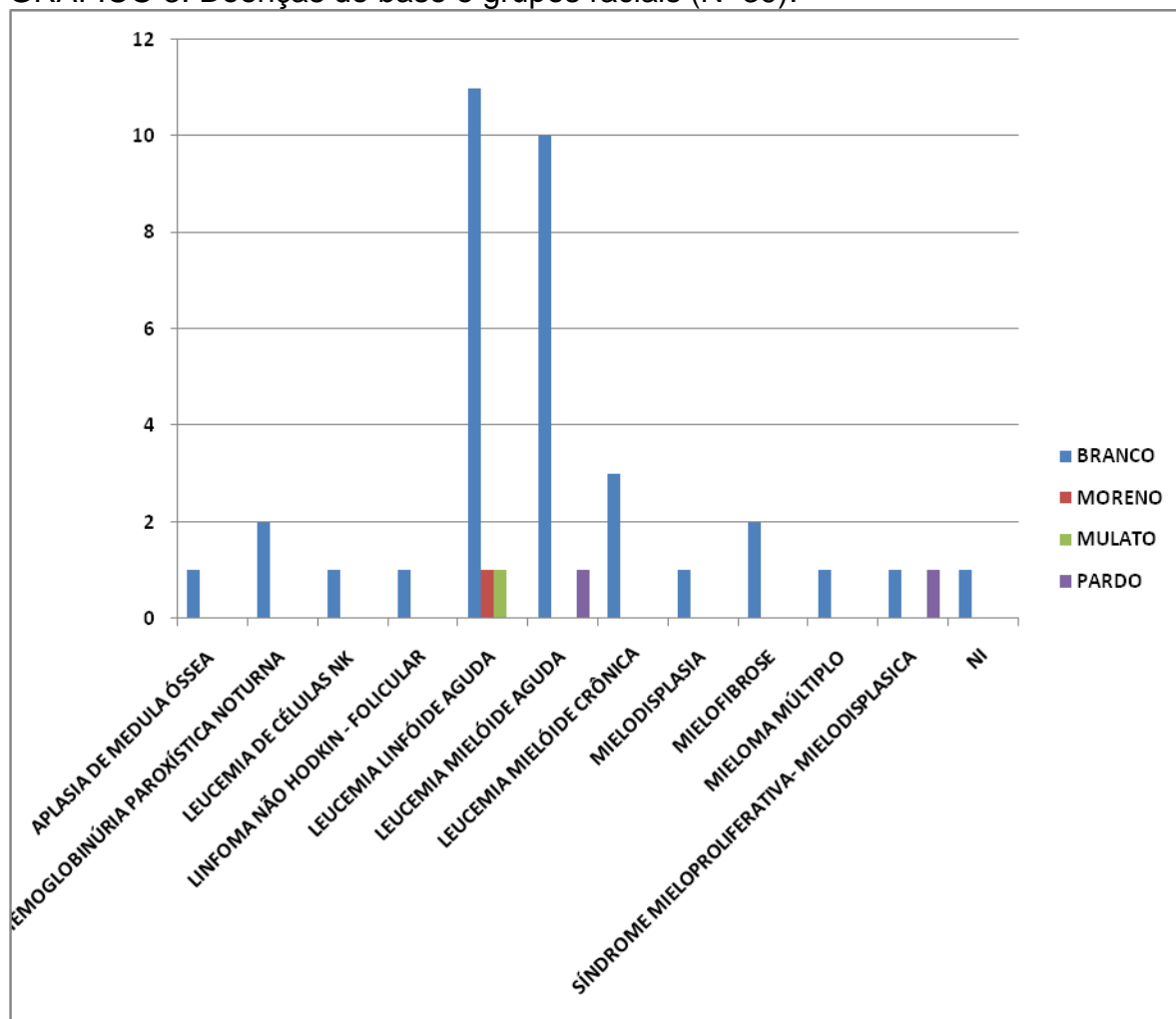
Estes pacientes também foram analisados com relação às doenças de base apresentadas e grupo racial ao qual pertenciam (GRÁFICO 3). Dos **13** indivíduos com Leucemia Linfóide Aguda, 84% (11) foram classificados como Brancos, 8% (1) Moreno e 8% (1) classificado como Mulato. Dos **11** pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, 91% (10) foram classificados como Brancos e 9% (1) como Pardo. Um grupo de **12** pacientes com doenças de base heterogênea, tais como, Aplasia de Medula Óssea (n=1), Hemoglobinúria Paroxística Noturna (n=2), Leucemia de Células *NK*, (n=1) Linfoma Não Hodgkin-Folicular(n=1), Leucemia Mielóide Crônica (3) , Mielodisplasia (1), Mielofibrose (2) e Mieloma Múltiplo (1), pertenciam ao grupo racial Branco. Dentre os **2** pacientes com Síndrome Mieloproliferativa- Mielodisplasica, 1 paciente foi classificado como Branco e 1 como Pardo. No entanto, para **1** paciente que pertencia ao grupo racial Branco não foi possível relacionar a doença de base.

GRÁFICO 2. Frequência de pacientes de acordo com seu grupo racial (N=39).



**Gráfico 2.** Dados sobre grupo racial foram obtidos através de entrevista e, posteriormente conferidos nos prontuários médicos. A denominação dos grupos raciais adotada foi de acordo com a sugerida pelo IBGE.

GRÁFICO 3. Doenças de base e grupos raciais (N=39).



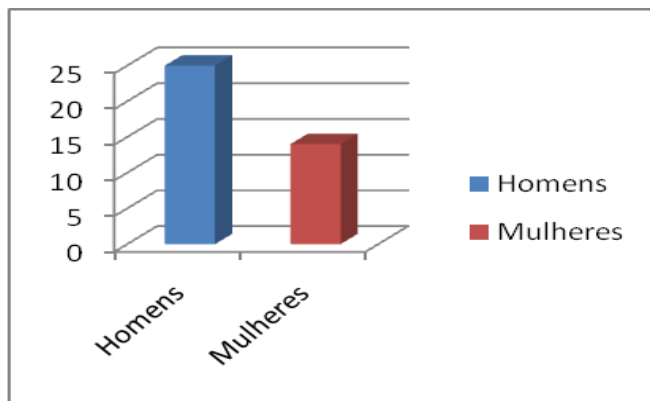
**Gráfico 3.** NI = doença não identificada. Paciente cujo dado sobre grupo racial não foi informado na entrevista e também não constava no prontuário médico.

A análise da distribuição dos pacientes (N=39) em relação ao sexo indicou que 64% (25) dos pacientes pertenciam ao sexo masculino e 36% (14) pertenciam ao sexo feminino (GRÁFICO 4).

A distribuição dos sexos dos pacientes também foi analisada considerando-se a doença de base e esses dados estão representados no Gráfico 5. O paciente (1) com Aplasia de Medula Óssea pertencia ao sexo feminino. Ambos (2) pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna pertenciam ao sexo masculino. O paciente (1) com a doença de base Linfoma Não-Hodking pertencia ao sexo feminino. No grupo de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (13), sete (7) pertenciam ao sexo masculino e seis (6) pertenciam ao sexo feminino. Dos 11 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, sete (7) eram do sexo masculino e quatro (4) do sexo feminino. Três pacientes (3) com Leucemia Mielóide Crônica eram do sexo masculino. O paciente (1) com a doença de base Mielodisplasia pertencia ao sexo masculino. Dois (2) pacientes com Mielofibrose, um pertencia

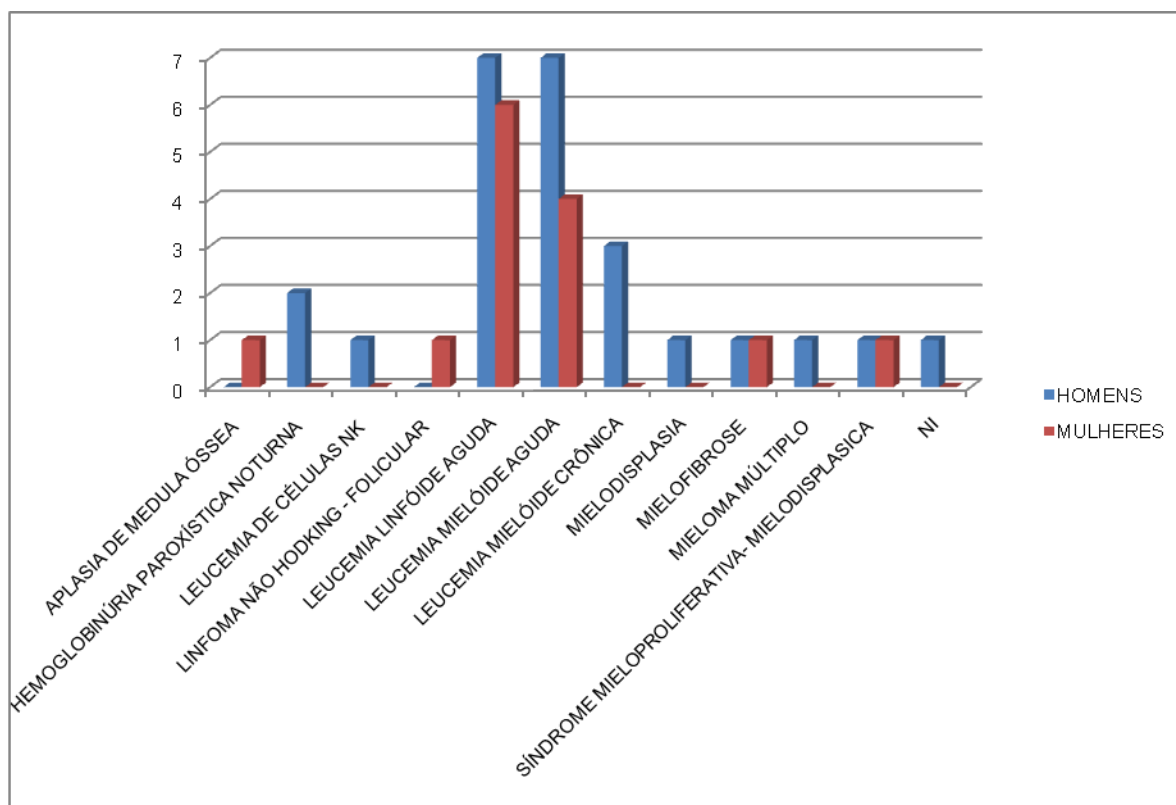
ao sexo masculino e o outro pertencia ao sexo feminino. O paciente com Mieloma Múltiplo era do sexo masculino. Dois pacientes com a Síndrome Mieloproliferativa Mielodisplásica, um pertencia ao sexo masculino e o outro um ao sexo feminino. O paciente com doença de base não referenciada pertencia ao sexo masculino.

GRÁFICO 4. Distribuição dos pacientes (N=39) de acordo com o sexo.



**Gráfico 4.** Informações sobre sexo dos pacientes foram obtidas na ficha de entrevista realizada no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR.

GRÁFICO 5. Representação dos pacientes (N=39) em relação ao sexo e doença de base.



**Gráfico 5.** NI = doença não identificada. Paciente cujo dado sobre grupo racial não foi informado na entrevista e também não constava no prontuário médico.

A média de idade dos pacientes foi de  $28,50 \pm 17,74$  anos. A média de idade dos pacientes também foi analisada por doença de base. Na Aplasia de Medula Óssea a média de idade foi de 30 anos. A média de idade para os pacientes com a Hemoglobinúria Paroxística Noturna foi de  $31,5 \pm 2,1$  anos. Pacientes com Leucemia de Células *NK* tiveram média de idade de 13 anos. Na doença de base Linfoma Não Hodgking Folicular a média de idade foi de 44 anos. A média de idade foi de  $15,2 \pm 16,7$  anos para pacientes com Leucemia Linfóide Aguda. Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda tiveram uma média de idade de  $35,7 \pm 17,8$  anos. A média de  $31,7 \pm 9,6$  anos foi encontrada para pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. Na Mielodisplasia a média de idade foi de 30 anos. Indivíduos com Mielofibrose tiveram a média de  $50,5 \pm 12,0$  anos. Na doença de base Mieloma Múltiplo a média de idade foi de 33 anos. Pacientes com a Síndrome Mieloproliferativa Mielodisplásica a média de idade foi de  $42 \pm 1,5$  anos.

As características epidemiológicas gerais dos pacientes estão representadas na Tabela 7.



TABELA 7. Características gerais dos pacientes.

Doença de base	N	(%)	Sexo		Idade		Grupo Étnico			
			M	F	Média	Desv. Pad.	Branco	Moreno	Mulato	Pardo
APLASIA DE MEDULA ÓSSEA	1	0.03	0	1	30.0	0.00	1	0	0	0
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA	2	0.05	2	0	31.5	2.10	2	0	0	0
LEUCEMIA DE CÉLULAS NK	1	0.03	1	0	13.0	0.00	1	0	0	0
LINFOMA NÃO HODKIN - FOLICULAR	1	0.03	0	1	39.0	0.00	1	0	0	0
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	13	0.33	7	6	15.2	16.70	11	1	1	0
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	11	0.28	7	4	35.7	17.80	3	0	0	0
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	3	0.08	3	0	31.7	9.60	1	0	0	0
MIELO DISPLASIA	1	0.03	1	0	23.0	0.00	2	0	0	0
MIELOFIBROSE	2	0.05	1	1	50.5	12.00	1	0	0	0
MIELOMA MÚLTIPLO	1	0.03	1	0	40.0	0.00	1	0	0	1
SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVA-MIELODISPLÁSICA	2	0.05	1	1	42.0	1.40	10	0	0	1
NÃO INFORMADO	1	0.03	1	0	NI	NI	1	0	0	0
TOTAIS	39	1	25	14			35	1	1	2
			39				39			

**Tabela 7.** M= masculino; F = feminino; Desv. Pad.= desvio padrão. Nesta tabela estão representados 38 pacientes (N=39), dos quais os dados sobre a doença de base dos pacientes foram obtidos por entrevista e através de prontuários médicos.

### 6.1.3 Doença de base do paciente vs número de irmãos

Para analisar o tamanho das irmandades foram excluídas famílias (5) com composição paciente/pai/mãe ou paciente/filhos, além do pai, mãe e paciente, das outras 34 famílias, o que totalizou 100 indivíduos. Número médio de irmãos e tamanho da irmandade foram averiguados entre os 136 indivíduos restantes pertencentes às 34 famílias. A média de irmãos observada por irmandade foi de 4

O tamanho médio da irmandade foi também analisado considerando-se a doença de base. Uma média de dois irmãos por paciente (1) com Aplasia de Medula Óssea, enquanto uma média de 3 irmãos foi observado para os pacientes (2) com Hemoglobinúria Paroxística Noturna. Para Leucemia de Células *NK* observou-se uma média de um irmão e para o Linfoma Não-Hodking Folicular, observou-se uma média de um irmão. Uma média de 2,4 irmãos foi observada para pacientes com Leucemia Linfóide Aguda e para o grupo de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda uma média de 4,5 irmãos. O grupo de pacientes com

Leucemia Mielóide Crônica apresentou uma média de 6.3 irmãos. Uma média de 8 irmãos foi observada para a Mielodisplasia. Uma média de 1,5 irmãos foi observada para pacientes (2) com a doença de base Mielofibrose. Para o Mieloma Múltiplo uma média de 12 irmãos. Na Síndrome Mieloproliferativa Mielodisplásica foi observada uma média de 2,5 irmãos. E, a média de um irmão por paciente onde não havia informação sobre a doença de base. (GRÁFICO 6).

A composição e frequências raciais das irmandades, totalizando 89% (121) indivíduos Brancos, 4% (6) Morenos, 2% (2) Mulatos e 5% (7) estão representadas no Gráfico 7. A composição racial das irmandades foi também analisada considerando-se a doença de base dos pacientes (GRÁFICO 8).

GRÁFICO 6. Média de irmãos por grupos de pacientes com doenças de base distintas (N=136).

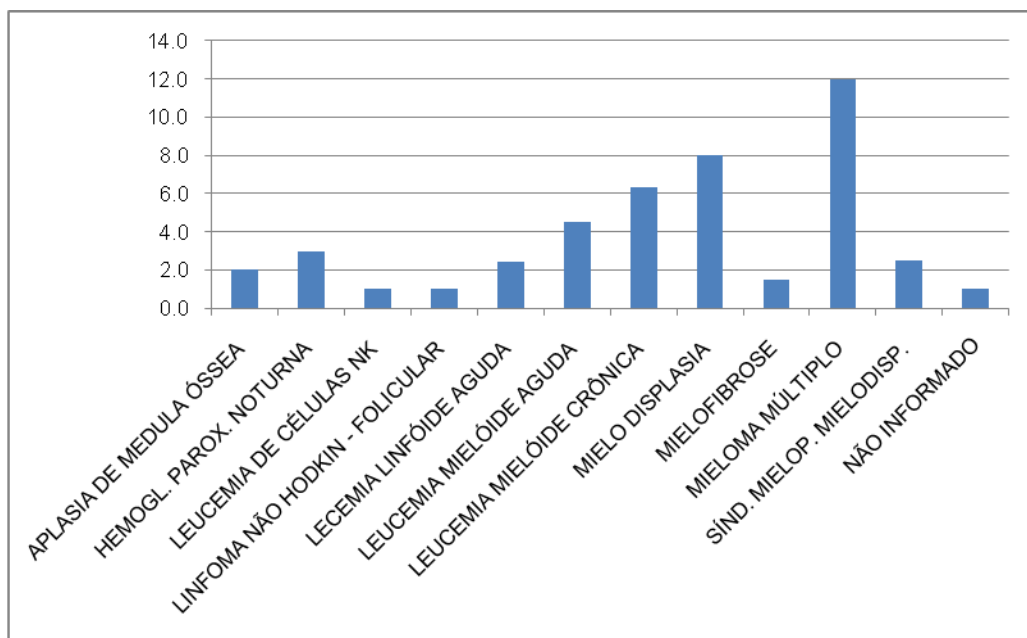


Gráfico 6. NI = doença não identificada. Paciente cujo dado sobre grupo racial não foi informado na entrevista e também não constava no prontuário médico.

GRÁFICO 7. Frequência das irmandades de acordo com seu grupo racial (N=136).

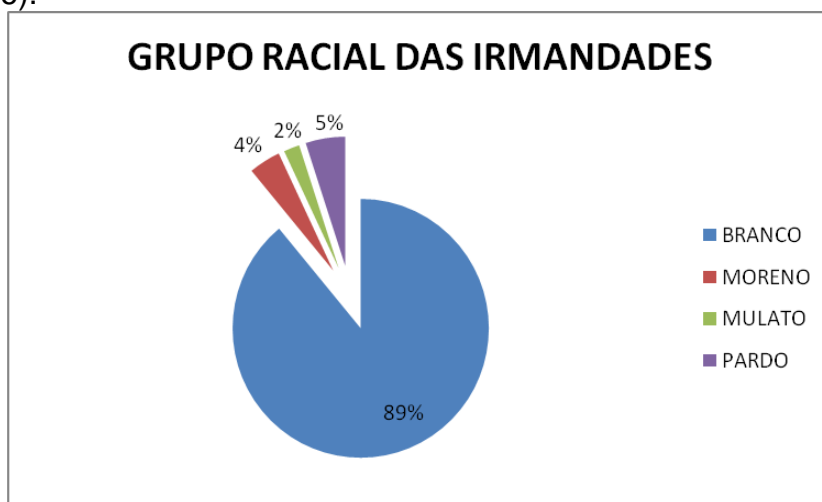


Gráfico 7. Dados sobre etnia que foram obtidos através de entrevista e nos prontuários médicos. A denominação dos grupos raciais adotada foi de acordo com a sugerida pelo IBGE.

GRÁFICO 8. Doença de base dos pacientes e grupo racial das irmandades (N=136).

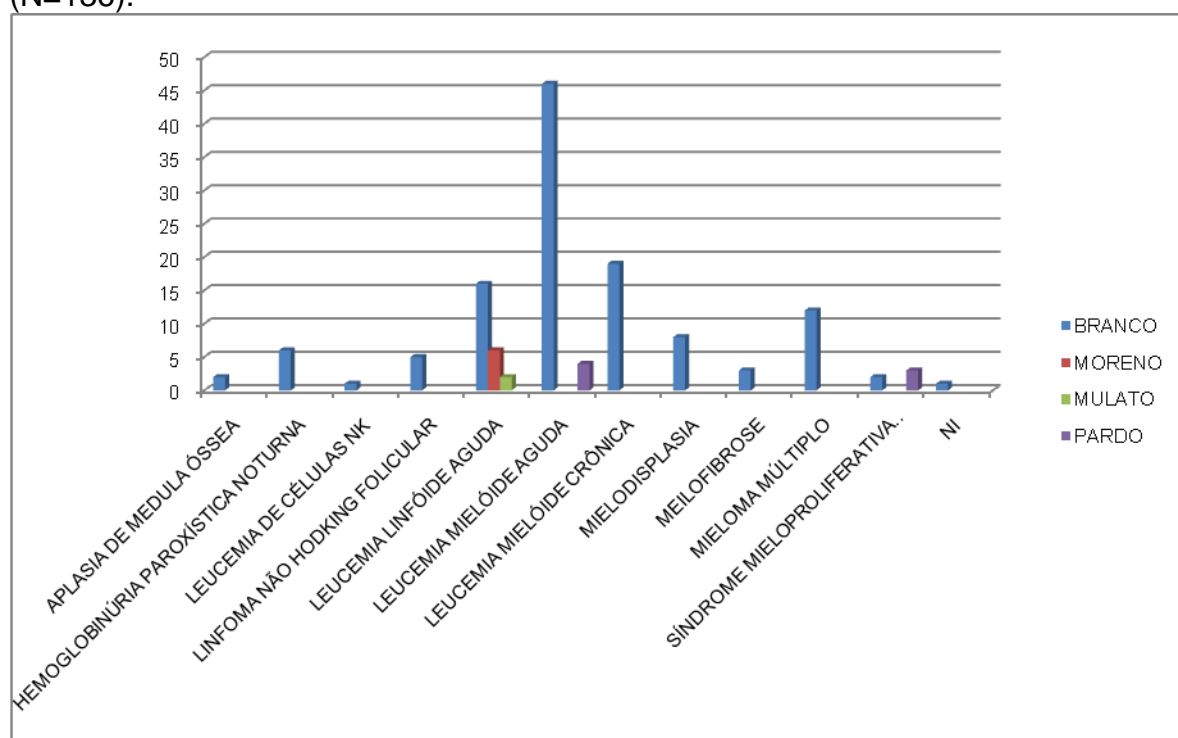


Gráfico 8. NI = doença não identificada. Paciente cujo dado sobre grupo étnico não foi informado na entrevista e também não constava no prontuário médico.

A análise da distribuição das irmandades (N=136) em relação ao sexo indicou 54% (74) do sexo masculino e 46% (62) do sexo feminino (GRÁFICO 9). A distribuição dos sexos nas irmandades também foi analisada considerando-se a doença de base do paciente de cada grupo familiar. Na Aplasia de Medula Óssea os irmãos eram um do sexo masculino e o outro do sexo feminino. Quanto a distribuição dos sexos nas irmandades de pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna, observou-se que um indivíduo era do sexo masculino e cinco do sexo feminino. Na Leucemia de Células *NK* observou-se um único irmão do sexo masculino. Para a doença de base Linfoma Não Hodgking Folicular a proporção sexual observada foi de um indivíduo do sexo masculino e quatro indivíduos do sexo feminino.

Um total de 24 indivíduos formava o grupo de irmandades para a doença de base Leucemia Linfóide Aguda, sendo que, 11 pertenciam ao sexo masculino e 13 pertenciam ao sexo feminino. Na Leucemia Mielóide Aguda, o grupo de irmãos era formado 50 indivíduos, 29 do sexo masculino e 21 do sexo feminino. O grupo de irmandades na Leucemia Mielóide Crônica era formado por 10 indivíduos do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Na Mielodisplasia, o grupo de irmandade era formado por cinco indivíduos do sexo masculino e três do sexo feminino. Na Mielofibrose, dois indivíduos eram do sexo masculino e um do sexo feminino. O grupo de irmandades no Mieloma Múltiplo era formado por indivíduos do sexo masculino e quatro do sexo feminino. Na Síndrome Mieloproliferativa Mielodisplásica, o grupo de irmãos era formado por quatro indivíduos do sexo masculino e um do sexo feminino. Um único indivíduo do sexo masculino pertencia à irmandade do paciente que não constava dado sobre a doença de base na ficha de entrevista e nos prontuários médicos (GRÁFICO 10).

GRÁFICO 9. Distribuição das irmandades (N=136) de acordo com o sexo.

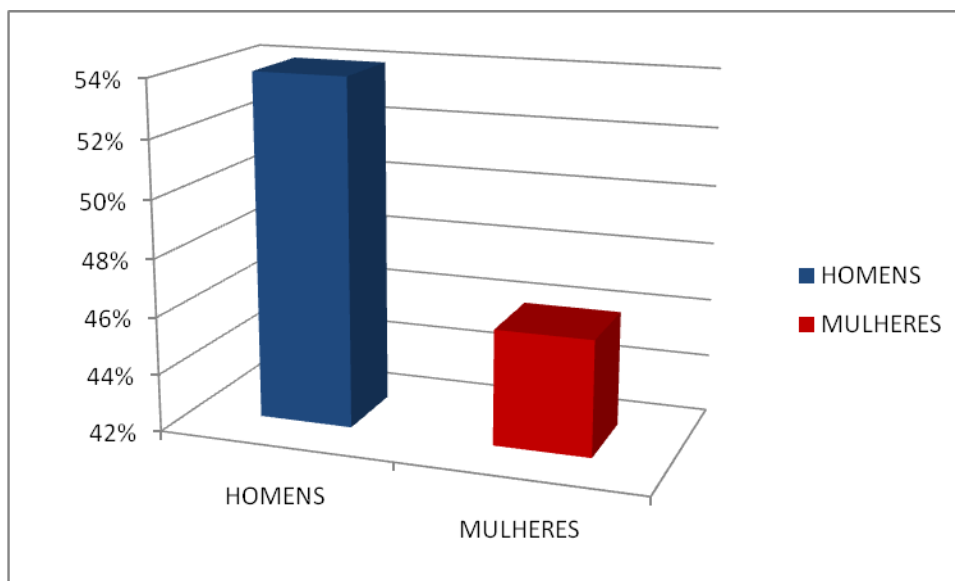


Gráfico 9. Informações sobre sexo das irmandades foram obtidas na ficha de entrevista realizada no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR.

GRÁFICO 10. Representação das irmandades (N=136) em relação ao sexo e doença de base.

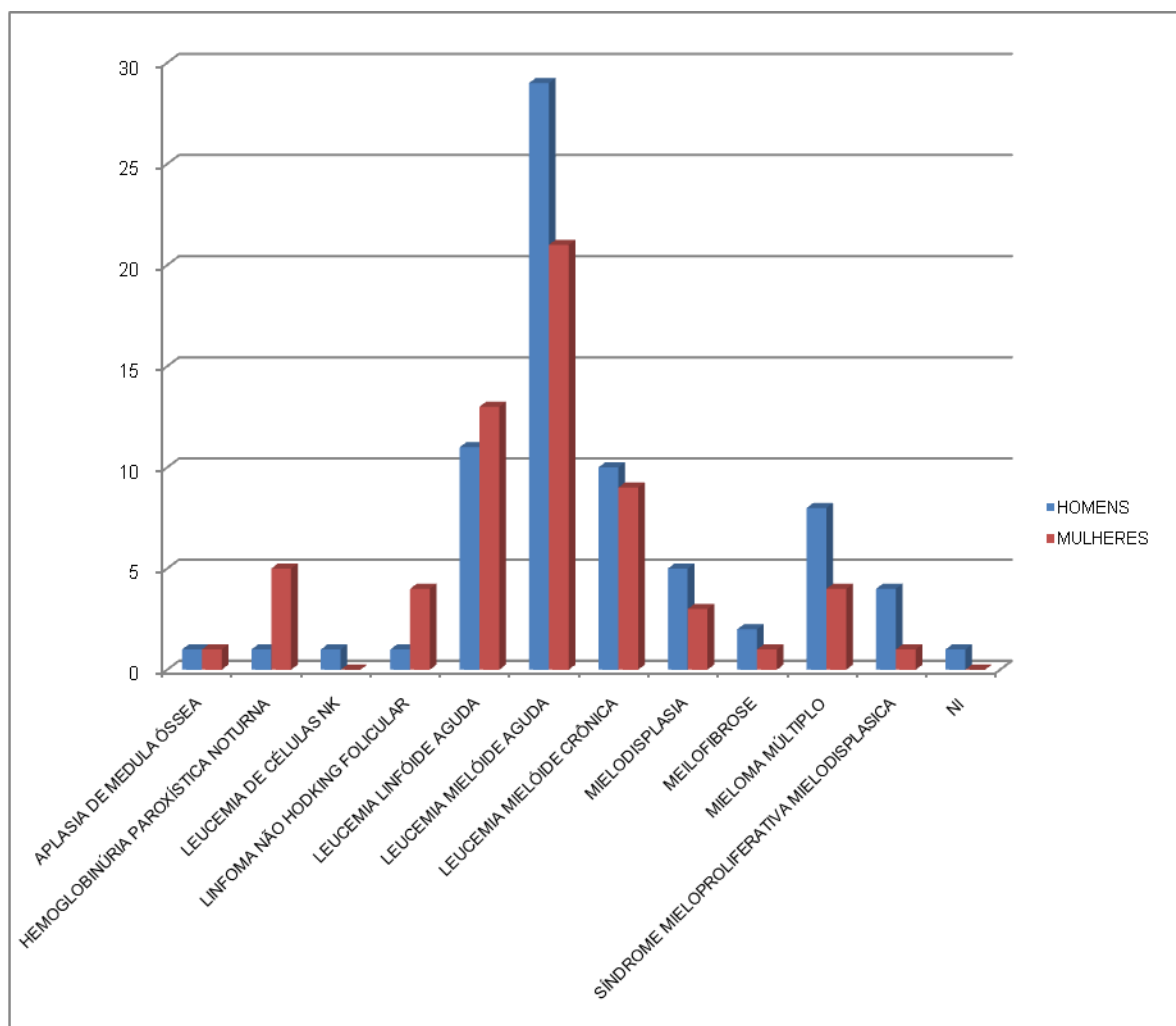


Gráfico 10. NI = doença não identificada. Paciente cujo dado sobre grupo étnico não foi informado na entrevista e também não constava no prontuário médico.

A média de idade das irmandades foi de  $35 \pm 13,55$  anos. A comparação das médias de idade entre os pacientes independentemente de sua doença de base e suas irmandades não demonstrou diferenças significativas ( $t = 1,53$ ;  $p < 0,03$ ).

As características epidemiológicas gerais das irmandades estão representadas na Tabela 8.

TABELA 8. Características gerais das irmandades.

Doença de Base	Irmãos				Sexo		Idade	
	Fam	Tam	Média	Desv. Pad.	M	F	Média	Desv Pad
APLASIA DE MEDULA ÓSSEA	1	2	2.0	0.00	1	1	36.0	1.41
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA	2	6	3.0	2.83	1	5	29.5	6.63
LEUCEMIA DE CÉLULAS NK	1	1	1.0	0.00	1	0	19.0	0.00
LINFOMA NÃO HODKIN – FOLICULAR	1	5	1.0	0.00	1	4	37.2	5.67
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	13	24	2.4	1.90	11	13	23.2	19.32
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	11	50	4.5	2.91	29	21	40.7	10.01
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	3	19	6.3	3.21	10	9	35.1	9.65
MIELO DISPLASIA	1	8	8.0	0.00	5	3	43.3	5.52
MIELOFIBROSE	2	3	1.5	2.12	2	1	54.0	4.36
MIELOMA MÚLTIPLO	1	12	12.0	0.00	8	4	31.9	9.13
SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVA-MIELODISPLASICA	2	5	2.5	0.71	4	1	44.8	7.73
Não Informado	1	1	1.0	0.00	1	0	21.0	0.00
Totais	39	136	3.8		74	62		

136

Tabela 8. M= masculino; F = feminino; Desv. Pad.= desvio padrão. Nesta tabela estão representados 136 indivíduos pertencentes ao grupo de irmandades (N=136).

## 6.2. FREQUÊNCIAS DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS GENES *KIR* NOS PACIENTES.

As frequências da presença/ausência dos 16 genes *KIR* são apresentadas na Tabela 9. Esses dados foram também comparados com estudo similar realizado pelo grupo de pesquisa do LIGH em controles da população de Curitiba. Como resultado dessa comparação observamos que os genes *KIR2DL2* ( $p=0,0005$ ); *KIR2DL5* ( $p=0,0067$ ); *KIR2DS1* ( $p=0,0013$ ); *KIR2DS2* ( $p=0,0038$ ) e *KIR2DS3* ( $p=0,0153$ ) apresentaram valores estatisticamente significantes conforme pode ser observado na Tabela 10. A comparação entre pacientes LLA e LMA apresentou diferença significativa para o gene *KIR2DS3* ( $p=0,0013$ ) como pode ser observado na Tabela 11.

TABELA 09. Distribuição das frequências dos gene *KIR* nos pacientes (N=39).

		Genes <i>KIR</i>															
		2DL1	2DL2	2DL3	<b>2DL4</b>	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	<b>3DL2</b>	<b>3DL3</b>	<b>3DP1</b>	3DS1
<b>Pacientes</b> <b>N = 39</b>	freq abs	35	9	36	39	11	37	6	12	5	36	11	37	39	39	39	10
	freq rel	0,90	0,23	0,92	1,00	0,28	0,95	0,15	0,31	0,13	0,92	0,28	0,95	1,00	1,00	1,00	0,26
	fre gen	0,68	0,12	0,72	1,00	0,15	0,77	0,08	0,17	0,07	0,72	0,15	0,77	1,00	1,00	1,00	0,14
<b>Aplasia de Medula Óssea</b> <b>N = 1</b>	freq abs	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Hemoglobinúria Paroxística</b> <b>Noturna</b> <b>N = 2</b>	freq abs	2	0	2	2	0	2	0	1	0	2	0	2	2	2	2	0
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,29	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<b>Leucemia de Células NK</b> <b>N = 1</b>	freq abs	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<b>Linfoma Não Hodking</b> <b>Folicular</b> <b>N = 1</b>	freq abs	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<b>Leucemia Linfóide Aguda</b> <b>N = 13</b>	freq abs	12	3	12	13	4	13	2	3	2	12	5	13	13	13	13	2
	freq rel	0,92	0,23	0,92	1,00	0,31	1,00	0,15	0,23	0,15	0,92	0,38	1,00	1,00	1,00	1,00	0,15
	fre gen	0,72	0,12	0,72	1,00	0,17	1,00	0,08	0,12	0,08	0,72	0,22	1,00	1,00	1,00	1,00	0,08
<b>Leucemia Mielóide Aguda</b> <b>N = 11</b>	freq abs	8	3	9	11	4	9	2	5	2	9	3	10	11	11	11	5
	freq rel	0,73	0,27	0,82	1,00	0,36	0,82	0,18	0,45	0,18	0,82	0,27	0,91	1,00	1,00	1,00	0,45
	fre gen	0,48	0,15	0,57	1,00	0,20	0,57	0,10	0,26	0,10	0,57	0,15	0,70	1,00	1,00	1,00	0,26
<b>Leucemia Mielóide Crônica</b> <b>N = 3</b>	freq abs	3	0	3	3	0	3	0	0	0	3	1	3	3	3	3	0
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,18	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<b>Mielodisplasia</b> <b>N = 1</b>	freq abs	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	freq rel	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	fre gen	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Mielofibrose</b> <b>N = 2</b>	freq abs	2	0	2	2	0	2	0	0	0	2	0	2	2	2	2	0
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<b>Mieloma Múltiplo</b> <b>N = 1</b>	freq abs	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
	freq rel	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<b>Síndrome Mieloproliferativa</b> <b>Mielodisplásica</b> <b>N = 2</b>	freq abs	2	0	2	2	0	2	0	0	0	2	0	2	2	2	2	1
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,29
<b>Não Informado</b> <b>N = 1</b>	freq abs	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
	freq rel	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00

**Tabela 9.** Os genes em negrito são aqueles denominados de genes de “moldura”.



TABELA 10. Frequência de cada gene *KIR* dos pacientes (n=39) e população controle normal (N=136).

	PACIENTE	CONTROLE	p-value
GENE <i>KIR</i>	(n=39)	(n=136)	
<i>KIR2DL1</i>	35 (90%)	130 (96%)	0.2329 (ns)
<b><i>KIR2DL2</i></b>	9 (23%)	75 (55%)	<b>0.0005 (*)</b>
<i>KIR2DL3</i>	36 (92%)	118 (87%)	0.4173 (ns)
<i>KIR2DL4</i>	39 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<b><i>KIR2DL5</i></b>	11 (28%)	72 (53%)	<b>0.0067 (*)</b>
<i>KIR2DP1</i>	37 (95%)	131 (96%)	0.6465 (ns)
<b><i>KIR2DS1</i></b>	6 (15%)	59 (43%)	<b>0.0013 (*)</b>
<b><i>KIR2DS2</i></b>	12 (31%)	78 (57%)	<b>0.0038 (*)</b>
<b><i>KIR2DS3</i></b>	5 (13%)	45 (33%)	<b>0.0153 (*)</b>
<i>KIR2DS4</i>	36 (92%)	129 (95%)	0.6936 (ns)
<i>KIR2DS5</i>	11 (28%)	45 (33%)	0.6976 (ns)
<i>KIR3DL1</i>	37 (95%)	129 (95%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL2</i>	39 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL3</i>	39 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DP1</i>	39 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DS1</i>	10 (26%)	53 (39%)	0.1356 (ns)

Tabela10.Os genes em negrito apresentaram significância para o teste estatístico.

TABELA 11. Frequência de cada gene *KIR* de pacientes LLA (N=12) e LMA (N=11).

	LLA	LMA	p-value
GENE <i>KIR</i>	(n=12)	(n=11)	
<i>KIR2DL1</i>	11 (92%)	8 (73%)	0.3168 (ns)
<i>KIR2DL2</i>	3 (25%)	3 (27%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL3</i>	11 (92%)	9 (82%)	0.5901 (ns)
<i>KIR2DL4</i>	12 (100%)	11 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL5</i>	4 (33%)	4 (36%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DP1</i>	12 (100%)	9 (82%)	0.2174 (ns)
<i>KIR2DS1</i>	10 (83%)	9 (82%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DS2</i>	3 (25%)	3 (27%)	1.0000 (ns)
<b><i>KIR2DS3</i></b>	2 (17%)	9 (82%)	<b>0.0031 (*)</b>
<i>KIR2DS4</i>	11 (92%)	9 (82%)	0.5921 (ns)
<i>KIR2DS5</i>	5 (42%)	3 (27%)	0.6668 (ns)
<i>KIR3DL1</i>	12 (100%)	10 (91%)	0.4783 (ns)
<i>KIR3DL2</i>	12 (100%)	11 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL3</i>	12 (100%)	11 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DP1</i>	12 (100%)	11 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DS1</i>	2 (17%)	5 (45%)	0.1930 (ns)

Tabela11.Os genes em negrito apresentaram significância para o teste estatístico.

### 6.2.1 GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS *KIR* DOS PACIENTES

Os genótipos *KIR* de pacientes definidos no presente estudo estão listados na Tabela 12, juntamente com o número total de locos e suas frequências absoluta e relativa, bem como o número de locos inibidores e ativadores.

Dentre os 39 pacientes, foram observados 18 diferentes configurações genotípicas *KIR*. Nossos resultados foram comparadas com o trabalho de HSU et al 2002 e, no presente estudo encontramos 6 genótipos também nomeados pelos autores no referido trabalho. Esses genótipos foram:

- Genótipo AF (também referidos como AG ou AJ);
- Genótipo AH (também referido como AL);
- Genótipo C (também referido como O);
- Genótipo E (também referido como F, H ou S);
- Genótipo M (também referidos como N);
- Genótipo Z (também referido como AA).

O número total de locos *KIR* presentes na composição do repertório *KIR* de cada indivíduo variou entre um mínimo de 8 e um máximo de 15.

Analisando-se apenas os locos ativadores na composição do repertório *KIR* individual, observamos o número mínimo de 1 e o máximo de 5 locos. No que se refere aos genes *KIR* inibidores, a variação mínima e máxima observada foi de 3 e 6 locos, respectivamente. Pelo fato do loco *2DL4*, dependendo das circunstâncias, apresentar função ativadora ou inibidora, a frequência desse gene não foi incluída, quando presente, tanto no grupo de locos ativadores quanto no grupo de locos inibidores.

O genótipo mais frequente (0,44%) entre os pacientes foi o “Genótipo 1” conforme referido na Tabela 12, que apresenta 1 loco *KIR* ativador, além de 5 locos inibidores.

TABELA 12. Genótipos e haplótipos *KIR* observados nos pacientes.

		Genes <i>KIR</i>																			Freq		Haplótipos				
Genótipos	*Gen	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2	Ativ	Inib	Total	Abs	Rel	Hap	HaploIHP	Prob		
1	AF, AG ou AJ	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	5	9	17	0,44	A	A	1	C37	0.6203
2	AH ou AI	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	4	6	13	2	0,05	A	B	1	42	0.5461
3	C, G ou O	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	5	6	15	2	0,05	B	B	2	42	0.6808
4	E, F, H ou S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	5	11	2	0,05	B	A	2	1	0.5641
5	NN1P	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	5	10	2	0,05	B	A	17	1	0.5208
6	NN2P	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	2	5	10	2	0,05	A	B	1	H26	0.5094
7	M ou N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	3	6	13	1	0,03	A	B	1	14	0.2471
8	Z ou AA	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	3	8	1	0,03	B	B	2	2	0.5160
9	NN3P	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	4	5	12	1	0,03	B	B	H34	42	0.4183
10	NN4P	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	3	6	12	1	0,03	A	B	1	5	0.5505
11	NN5P	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	2	6	11	1	0,03	A	B	1	3	0.5505
12	NN6P	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	4	3	9	1	0,03	B	B	H5	C12	0.6974
13	NN7P	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	2	5	10	1	0,03	A	B	1	H34	0.5505
14	NN8P	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	4	8	1	0,03	B	B	C37	C37	1.0000
15	NN9P	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	4	5	13	1	0,03	B	B	2	C140	0.6486
16	NN10P	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	2	4	10	1	0,03	B	B	H26	C53	0.9467
17	NN11P	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	3	5	12	1	0,03	B	B	2	H34	1.0000
18	NN12P	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	3	6	12	1	0,03	B	B	H34	C140	1.0000
Média																		2,72	5,00		39	1,00					
Desv Pad																		1,13	0,97								

**Tabela 12.** \*Gen = genótipos designados segundo HSU et al., 2002, aqueles denominados por NN foram os genótipos dos pacientes não encontrados e nomeados por esta referência bibliográfica. Os genes de “moldura” estão representados em negrito. Ativ = genes ativadores e Inib = genes inibidores; Abs = frequências absolutas; Rel = frequências relativas; Hap = combinação de haplótipos, A e B. HaploIHP = Haplótipos inferidos pelo software HaploIHP utilizando os Padrões de Haplótipos Identificados em KHAKOO & CARRINGTON, 2006. Prob = probabilidade de cada genótipo ser formado por esta combinação de haplótipos. O número 1 indica a presença e 0 a ausência dos locos *KIR*.

### 6.3.FREQÜÊNCIAS DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS GENES *KIR* NAS IRMANDADES.

O grupo de irmandades (N=136) também foi analisado quanto à presença/ausência dos 16 genes *KIR* e os resultados encontram-se relacionados na Tabela 13. Esses dados foram também comparados com estudo similar realizado pelo grupo de pesquisa do LIGH em controles da população de Curitiba. Como resultado dessa comparação observamos que os genes *KIR2DL1* ( $p= 0,0171$ ), *KIR2DL2* ( $p= 0,0000$ ); *KIR2DS2* ( $p=0,0001$ ); *KIR2DS3* ( $p=0,0018$ ); e *KIR2DS4* ( $p=0,0012$ ) apresentaram valores estatisticamente significantes conforme pode ser observado na Tabela 14.

TABELA 13. Distribuição das frequências dos gene *KIR* nas irmandades (N=136).

		Genes <i>KIR</i>															
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
Irmandades N = 136	freq abs	118	41	117	136	58	122	52	44	22	112	54	124	136	136	136	58
	freq rel	0,87	0,30	0,86	1,00	0,43	0,90	0,38	0,32	0,16	0,82	0,40	0,91	1,00	1,00	1,00	0,43
	fre gen	0,64	0,16	0,63	1,00	0,24	0,68	0,21	0,18	0,08	0,58	0,22	0,70	1,00	1,00	1,00	0,24
Aplasia de Medula Óssea N = 2	freq abs	1	0	1	2	0	1	1	0	0	2	1	2	2	2	2	0
	freq rel	0,50	0,00	0,50	1,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	0,29	0,00	0,29	1,00	0,00	0,29	0,29	0,00	0,00	1,00	0,29	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
Hemoglobinúria Paroxística Noturna N = 6	freq abs	2	4	2	6	0	2	0	6	0	6	0	6	6	6	6	0
	freq rel	0,33	0,67	0,33	1,00	0,00	0,33	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	0,18	0,42	0,18	1,00	0,00	0,18	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
Leucemia de Células <i>NK</i> N = 1	freq abs	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
Linfoma Não Hodgking Folicular N = 5	freq abs	4	0	4	5	0	5	0	0	0	5	0	5	5	5	5	0
	freq rel	0,80	0,00	0,80	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	0,55	0,00	0,55	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
Leucemia Linfóide Aguda N = 24	freq abs	20	4	21	24	7	22	5	3	2	16	10	21	24	24	24	9
	freq rel	0,83	0,17	0,88	1,00	0,29	0,92	0,21	0,13	0,08	0,67	0,42	0,88	1,00	1,00	1,00	0,38
	fre gen	0,59	0,09	0,65	1,00	0,16	0,71	0,11	0,06	0,04	0,42	0,24	0,65	1,00	1,00	1,00	0,21
Leucemia Mielóide Aguda N = 50	freq abs	46	13	45	50	25	48	21	15	11	40	19	42	50	50	50	24
	freq rel	0,92	0,26	0,90	1,00	0,50	0,96	0,42	0,30	0,22	0,80	0,38	0,84	1,00	1,00	1,00	0,48
	fre gen	0,72	0,14	0,68	1,00	0,29	0,80	0,24	0,16	0,12	0,55	0,21	0,60	1,00	1,00	1,00	0,28
Leucemia Mielóide Crônica N = 19	freq abs	19	3	18	19	10	19	9	3	2	15	13	19	19	19	19	9
	freq rel	1,00	0,16	0,95	1,00	0,53	1,00	0,47	0,16	0,11	0,79	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	0,47
	fre gen	1,00	0,08	0,77	1,00	0,31	1,00	0,27	0,08	0,05	0,54	0,44	1,00	1,00	1,00	1,00	0,27
Mielodisplasia N = 8	freq abs	8	4	8	8	6	8	5	5	0	7	6	7	8	8	8	5
	freq rel	1,00	0,50	1,00	1,00	0,75	1,00	0,63	0,63	0,00	0,88	0,75	0,88	1,00	1,00	1,00	0,63
	fre gen	1,00	0,29	1,00	1,00	0,50	1,00	0,39	0,39	0,00	0,65	0,50	0,65	1,00	1,00	1,00	0,39
Mielofibrose N = 3	freq abs	3	0	3	3	0	3	1	0	0	3	2	3	3	3	3	2
	freq rel	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,33	0,00	0,00	1,00	0,67	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67
	fre gen	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,18	0,00	0,00	1,00	0,42	1,00	1,00	1,00	1,00	0,42
Mieloma Múltiplo N = 12	freq abs	8	11	9	12	7	7	7	10	6	11	0	12	12	12	12	7
	freq rel	0,67	0,92	0,75	1,00	0,58	0,58	0,58	0,83	0,50	0,92	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,58
	fre gen	0,42	0,71	0,50	1,00	0,35	0,35	0,35	0,59	0,29	0,71	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,35
Síndrome Mieloproliferativa Mielodisplásica N = 5	freq abs	5	1	5	5	2	5	2	1	0	5	2	5	5	5	5	2
	freq rel	1,00	0,20	1,00	1,00	0,40	1,00	0,40	0,20	0,00	1,00	0,40	1,00	1,00	1,00	1,00	0,40
	fre gen	1,00	0,11	1,00	1,00	0,23	1,00	0,23	0,11	0,00	1,00	0,23	1,00	1,00	1,00	1,00	0,23
Não Informado N = 1	freq abs	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	freq rel	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
	fre gen	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00

Tabela 13. Os genes em negrito são aqueles denominados de genes de “moldura”.

TABELA 14. Frequência de cada gene *KIR* das IRMANDADES (N=136) e população controle normal (N=136).

	IRMANDADE	CONTROLE	p-value
GENE <i>KIR</i>	(n=136)	(n=136)	
<b><i>KIR2DL1</i></b>	118 (87%)	130 (96%)	<b>0.0171 (*)</b>
<b><i>KIR2DL2</i></b>	41 (30%)	75 (55%)	<b>0.0000 (*)</b>
<i>KIR2DL3</i>	117 (86%)	118 (87%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL4</i>	136 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL5</i>	58 (43%)	72 (53%)	0.1114 (ns)
<i>KIR2DP1</i>	122 (90%)	131 (96%)	0.0545 (ns)
<i>KIR2DS1</i>	52 (38%)	59 (43%)	0.3915 (ns)
<b><i>KIR2DS2</i></b>	44 (32%)	78 (57%)	<b>0.0001 (*)</b>
<b><i>KIR2DS3</i></b>	22 (16%)	45 (33%)	<b>0.0018 (*)</b>
<b><i>KIR2DS4</i></b>	112 (82%)	129 (95%)	<b>0.0012 (*)</b>
<i>KIR2DS5</i>	54 (40%)	45 (33%)	0.3134 (ns)
<i>KIR3DL1</i>	124 (91%)	129 (95%)	0.2468 (ns)
<i>KIR3DL2</i>	136 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL3</i>	136 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DP1</i>	136 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DS1</i>	58 (43%)	53 (39%)	0.6218 (ns)

Tabela13.Os genes em negrito apresentaram significância para o teste estatístico.

### 6.3.1 GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS *KIR* DAS IRMANDADES.

Os genótipos *KIR* tipados nas irmandades estão listados na Tabela 15, juntamente com o número total de locos, frequências absoluta e relativa, bem como o número de locos inibidores e ativadores.

Dentre os 136 indivíduos pertencentes ao grupo de irmandades, foram observados 49 diferentes configurações genotípicas *KIR*. Esses resultados foram também comparadas com o trabalho de HSU et al 2002 e, no presente estudo encontramos 12 genótipos também nomeados pelos autores no referido trabalho. Esses genótipos foram:

- Genótipo AF (também referidos como AG ou AJ);
- Genótipo AH (também referido como AI);
- Genótipo E (também referido como F, H ou S);
- Genótipo C (também referido como O);
- Genótipo Z (também referido como AA);
- Genótipo AB;
- Genótipo B (também referido como L);
- Genótipo A (também referido como J e K);
- Genótipo AD;
- Genótipo P;
- Genótipo AE;
- Genótipo AC.

Dentre os 136 indivíduos pertencentes ao grupo de irmandades, foram observadas 49 diferentes configurações genotípicas *KIR*. Dentro de cada genótipo o número total de locos *KIR* varia, podendo ter um mínimo de 4 e um máximo de 9 genes. Se analisarmos apenas os locos ativadores, o número mínimo é de 1 e o máximo de 4 locos. Entretanto o número de genes inibidores que compõem um perfil é maior, podendo variar de 3 a 6 locos. Pelo fato do loco *2DL4*, dependendo das circunstâncias, apresentar função ativadora ou inibidora, a frequência para o gene codificante da proteína 2DL4 não foi incluída, quando presente, tanto no grupo de locos ativadores quanto no grupo de locos



inibidores. O genótipo mais freqüente entre os pacientes foi o genótipo 1, que apresenta 1 loco ativador, além de 5 locos inibidores.

TABELA 15. Genótipos e Haplótipos *KIR* das irmandades.

		Genes <i>KIR</i>															Ativ	Inib	Total	Freq		Haplótipos				
Genótipos	*Gen	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4				3DL2	Abs	Rel	Hap	HaplóHP	Prob	
1	AF, AG e AJ	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	41	0,30	A	A	18b	0.4419		
2	AH e AI	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	14	0,10	B	A	3	18b	0.5372	
3	E, F, H e S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	10	0,07	B	A	17	18b	0.3960	
4	C, G e O	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	5	0,04	A	A	1	1	0.4112		
5	Z e AA	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	4	0,03	B	A	2	18b	0.8881	
6	NN1IR	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	4	0,03	B	A	17	18b	0.3960	
7	NN2IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	3	0,02	B	B	H44	3	0.5402	
8	NN3IR	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	4	0,02	B	A	H71	18b	0.7988	
9	NN4IR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	3	0,02	B	B	10	3	0.2435	
10	AB	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	2	0,01	B	A	25	18b	0.6032	
11	Be L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	4	0,01	A	B	1	H71	0.3137	
12	NN5IR	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	3	0,01	A	A	H120	18b	1.0000	
13	NN6IR	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	3	0,01	B	B	H44	22	1.0000	
14	NN7IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	0,01	B	B	33	H151	0.2336	
15	NN8IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	3	0,01	B	B	3	32a	0.1737	
16	NN9IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0,01	B	A	H151	H226	0.5198	
17	NN10IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	2	0,01	B	A	H214	H120	0.5150	
18	NN11IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	2	0,01	B	A	3	H120	0.6584	
19	A, Je K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	4	0,01	B	B	2	5	0.2782	
20	AD	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	3	0,01	B	B	10	C107	0.2959	
21	P	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	3	0,01	A	B	1	28a	0.3380	
22	AE	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	3	0,01	B	A	33	18b	0.4054	
23	AC	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	4	0,01	B	A	10	18b	0.7988	
24	NN12IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	3	0,01	B	A	H214	18b	0.7102	
25	NN13IR	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0,01	B	A	H151	18b	0.5518	
26	NN14IR	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	5	0,01	A	A	H226	18b	1.0000
27	NN15IR	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	4	0,01	B	B	H71	H247	1.0000	
28	NN16IR	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	5	0,01	A	A	1	18b	0.4419
29	NN17IR	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	4	0,01	B	A	H71	H226	0.9141	
30	NN18IR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	2	0,01	B	B	H44	H247	0.8074	
31	NN19IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	3	0,01	B	B	H151	H327	0.5205	
32	NN20IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	3	0,01	A	B	18b	H316	0.5455	
33	NN21IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	3	0,01	A	B	18b	5	0.5455	
34	NN22IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	3	0,01	B	B	H44	C27	0.5402	
35	NN23IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0,01	A	B	H226	32a	0.2664	
36	NN24IR	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	4	0,01	B	A	33	1	0.1489	
37	NN25IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	2	0,01	B	A	H327	18b	0.4774	
38	NN26IR	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	3	0,01	B	A	H352	18b	0.4848	
39	NN27IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	5	0,01	A	B	H367	H37	0.4044
40	NN28IR	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	3	0,01	B	A	14	H226	0.1579	
41	NN29IR	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	5	0,01	A	A	H226	H120	1.0000
42	NN30IR	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	5	0,01	B	B	H185	H37	0.5773
43	NN31IR	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0,01	B	B	C99	C99	1.0000	
44	NN32IR	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	4	0,01	A	A	18b	18a	0.5825
45	NN33IR	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0,01	A	A	H367	18b	1.0000
46	NN34IR	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	4	0,01	B	B	H151	14	0.4064	
47	NN35IR	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	4	0,01	B	A	H330	H120	1.0000
48	NN36IR	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	3	0,01	A	B	H367	C107	1.0000	
49	NN37IR	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	3	0,01	A	B	H120	C107	1.0000	
Média																		2,53	4,94	136	1,00					
Desv Pad																		1,08	1,03							

**Tabela 15.** \*Gen = genótipos designados segundo HSU et al., 2002, aqueles denominados por NN foram os genótipos das irmandades não encontrados e nomeados por esta referência bibliográfica. Os genes de “moldura” estão representados em negrito. Ativ = genes ativadores e Inib = genes inibidores; Abs = frequências absolutas; Rel = frequências relativas; Hap = combinação de haplótipos, A e B. HaplóHP = Haplótipos inferidos pelo software HaplóHP utilizando os Padrões de Haplótipos Identificados em KHAKOO & CARRINGTON, 2006. Prob = probabilidade de cada genótipo ser formado por esta combinação de haplótipos. O número 1 indica a presença e 0 a ausência dos locos *KIR*.

#### 6.4. FREQUÊNCIAS DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS GENES *KIR* NOS PAIS (N=50). DOS PACIENTES.

Dentre as 39 famílias de pacientes, as frequências da presença/ausência dos 16 genes *KIR* foram analisadas em 25 famílias onde constavam dados de genotipagem *KIR* do pai e da mãe. Estes dados são apresentadas na tabela 16. Esses dados foram também comparados com estudo similar realizado pelo grupo de pesquisa do LIGH em controles da população de Curitiba. Como resultado dessa comparação observamos que os genes *KIR2DL2* ( $p= 0,0078$ ), *KIR2DS2* ( $p= 0,0466$ ) e *KIR2DS3* ( $p=0,0274$ ) apresentaram valores estatisticamente significantes conforme pode ser observado na Tabela 17.

TABELA 16. Distribuição das frequências dos gene KIR nos pais dos pacientes (N=136).

		Genes <i>KIR</i>															
		2DL1	2DL2	2DL3	<b>2DL4</b>	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	<b>3DL2</b>	<b>3DL3</b>	<b>3DP1</b>	3DS1
<b>PAIS</b> N = 50	freq abs	44	16	41	50	21	44	17	20	8	43	21	47	50	50	50	22
	freq rel	0,88	0,32	0,82	1,00	0,42	0,88	0,34	0,40	0,16	0,86	0,42	0,94	1,00	1,00	1,00	0,44
	fre gen	0,65	0,18	0,58	1,00	0,24	0,65	0,19	0,23	0,08	0,63	0,24	0,76	1,00	1,00	1,00	0,25

**Tabela 16.** Os genes em negrito são aqueles denominados de genes de “moldura”.

TABELA 17. Frequência de cada gene *KIR* dos PAIS (n=50) e população controle normal (136).

GENE <i>KIR</i>	PAIS (n=50)	CONTROLE (n=136)	p-value
<i>KIR2DL1</i>	44 (88%)	130 (96%)	0.0883 (ns)
<b><i>KIR2DL2</i></b>	16 (32%)	75 (55%)	<b>0.0078 (*)</b>
<i>KIR2DL3</i>	41 (82%)	118 (87%)	0.4817 (ns)
<i>KIR2DL4</i>	50 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL5</i>	21 (42%)	72 (53%)	0.1915(ns)
<i>KIR2DP1</i>	44 (88%)	131 (96%)	0.0714 (ns)
<i>KIR2DS1</i>	17 (34%)	59 (43%)	0.3131 (ns)
<b><i>KIR2DS2</i></b>	20 (40%)	78 (57%)	<b>0.0466 (*)</b>
<b><i>KIR2DS3</i></b>	8 (16%)	45 (33%)	<b>0.0274 (*)</b>
<i>KIR2DS4</i>	43 (86%)	129 (95%)	0.0585 (ns)
<i>KIR2DS5</i>	21 (42%)	45 (33%)	0.3008 (ns)
<i>KIR3DL1</i>	47 (94%)	129 (95%)	0.9957 (ns)
<i>KIR3DL2</i>	50 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL3</i>	50 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DP1</i>	50 (100%)	136 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DS1</i>	22 (44%)	53 (39%)	0.6136 (ns)

TABELA 17. Os valores em negrito apresentaram significância no teste estatístico.

#### 6.4.1 GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS *KIR* DOS PAIS.

Os genótipos *KIR* tipados nos pais de 25 pacientes estão listados, do mais freqüente ao menos freqüente, na Tabela 18, juntamente com o número total de locos, freqüências absoluta e relativa, bem como o número de locos inibidores e ativadores.

Dentre os 50 indivíduos pertencentes ao grupo de “pais de pacientes” irmandades, foram observados 24 diferentes configurações genotípicas *KIR*. Esses resultados foram também comparadas com o trabalho de HSU et al 2002 e, no presente estudo encontramos 9 genótipos descritos e nomeados pelos autores no referido trabalho e que usamos como referência. Esses genótipos foram:

- Genótipo AF (também referidos como AG ou AJ);
- Genótipo AH (também referido como AI);
- Genótipo E (também referido como F, H ou S);
- Genótipo B (também referido como L);
- Genótipo C (também referido como G ou O);
- Genótipo AB;
- Genótipo AC (também referido como L);
- Genótipo M (também referido como N);
- Genótipo P;

TABELA 18. Genótipos e haplótipos *KIR* dos pais.

Genótipos	*Gen	Genes <i>KIR</i>															Ativ	Inib	Total	Freq		Haplótipos					
		3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4				3DL2	Abs	Rel	Hap	HaploHP	Prob		
1	AF, AG e AJ	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	5	9	16	0,32	A	A	C11	1	0.4445
2	AH e AI	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	4	13	4	0,08	B	A	H42	1	0.4133	
3	E, F, H e S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	11	3	0,06	A	B	1	C30	0.2979	
4	NN1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	5	10	3	0,06	B	A	17	1	0.3401
5	Be L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	5	6	15	2	0,04	B	A	7	1	0.2044
6	C, Ge O	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	5	6	15	2	0,04	A	A	1	1	0.5499
7	NN2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	3	6	12	2	0,04	A	B	1	H12	0.6142
8	NN3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	13	2	0,04	B	B	H42	C180	0.5000
9	AB	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	4	4	11	1	0,02	A	B	C11	28a	1.0000
10	AC	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	5	4	12	1	0,02	A	B	C11	10	1.0000
11	Me N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	3	6	13	1	0,02	A	B	1	19a	0.1362
12	P	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	4	6	14	1	0,02	A	B	1	28a	0.5499
13	NN4	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	5	8	1	0,02	A	A	C11	C8	0.7418
14	NN5	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	4	4	11	1	0,02	B	B	H42	C19	0.7871
15	NN6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	4	6	13	1	0,02	B	B	17	25	1.0000
16	NN7	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	2	4	8	1	0,02	B	B	H23	C19	0.8646
17	NN8	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	3	6	12	1	0,02	B	B	25	C19	0.7615
18	NN9	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	3	9	1	0,02	B	B	C19	C30	1.0000
19	NN10	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	4	4	10	1	0,02	A	B	C11	C44	1.0000
20	NN11	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	3	4	11	1	0,02	B	B	C19	C80	0.9862
21	NN12	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	4	9	1	0,02	B	B	C103	C19	1.0000
22	NN13	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	5	4	13	1	0,02	B	B	10	H12	0.5000
23	NN14	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	2	3	9	1	0,02	B	B	C111	C30	0.8108
24	NN15	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	3	6	12	1	0,02	B	B	C164	C19	0.2960
Média															3,25	4,88		50	1,00								
Desv Pad															1,29	1,03											

**Tabela 18.** \*Gen = genótipos designados segundo HSU et al., 2002, aqueles denominados por NN foram os genótipos dos pais não encontrados e nomeados por esta referência bibliográfica. Os genes de “moldura” estão representados em negrito. Ativ = genes ativadores e Inib = genes inibidores; Abs = frequências absolutas; Rel = frequências relativas; Hap = combinação de haplótipos, A e B. HaplóHP = Haplótipos inferidos pelo software HaplóHP utilizando os Padrões de Haplótipos Identificados em KHAKOO & CARRINGTON, 2006. Prob = probabilidade de cada genótipo ser formado por esta combinação de haplótipos. O número 1 indica a presença e 0 a ausência dos locos *KIR*.

### 6.5. Comparação da frequência de Haplótipos de pacientes, irmandades e pais.

No Gráfico 11 estão representadas a distribuição de frequências de genótipos *KIR* (AA, AB e BB) de pacientes, irmandades e pai. No gráfico 12, estão representados os haplótipos *KIR*, A e B.

No presente estudo, observamos uma maior frequência de haplótipos A nos grupos analisados. Entre os 39 pacientes observamos 59% haplótipos A vs 41% haplótipos B; na irmandade 62% vs 38% e entre os pais, 57% vs 43%, respectivamente como pode ser observado na Gráfico 12.

GRÁFICO 11. Número de indivíduo que apresentam os diferentes genótipos *KIR* na amostra pacientes, irmandades e pais.

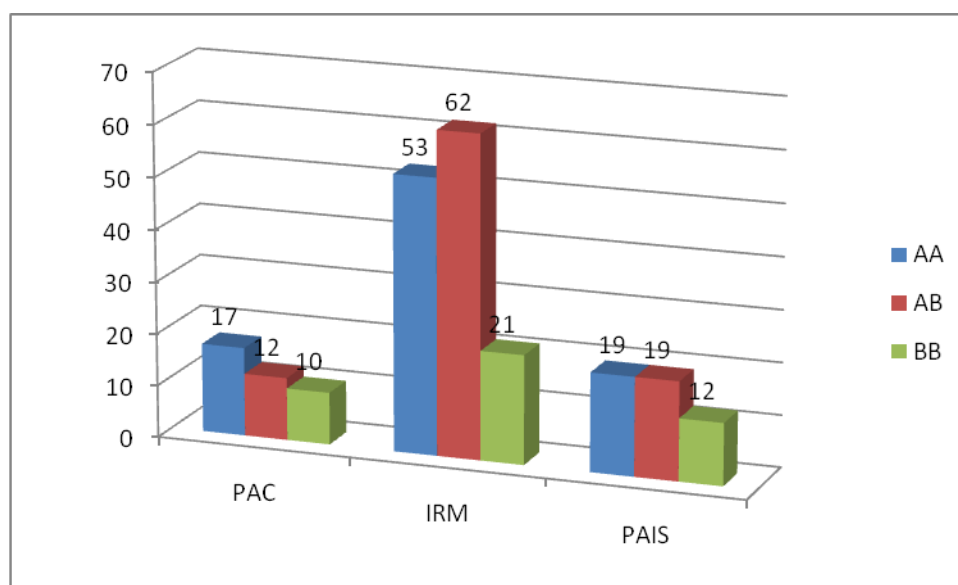


Gráfico 11. PAC = Pacientes; IRM = Irmandades e PAIS = Pais dos pacientes.

GRÁFICO 12. Distribuição da frequência haplotípica de pacientes, irmandades e pais.

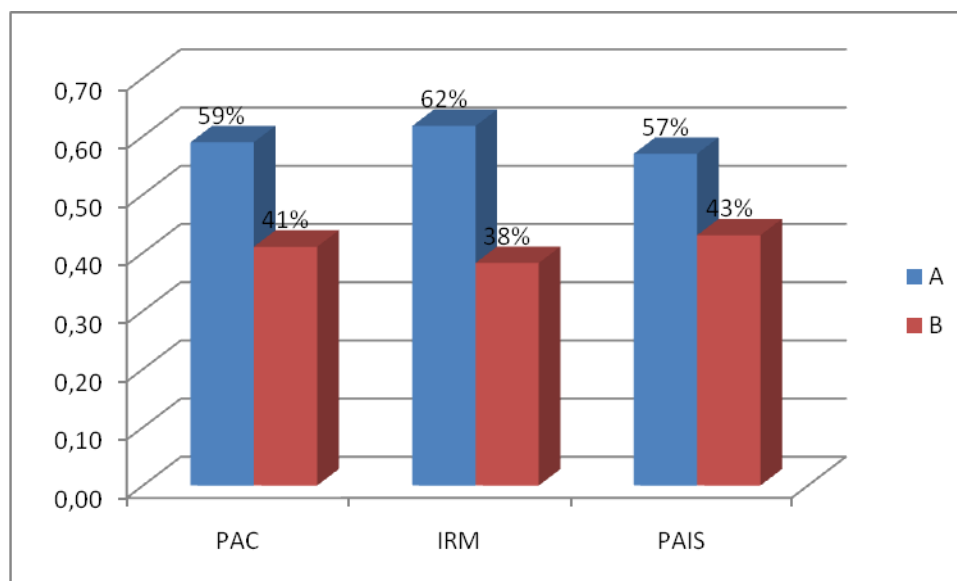


Gráfico 12. PAC = Pacientes; IRM = Irmandades e PAIS = Pais dos pacientes.

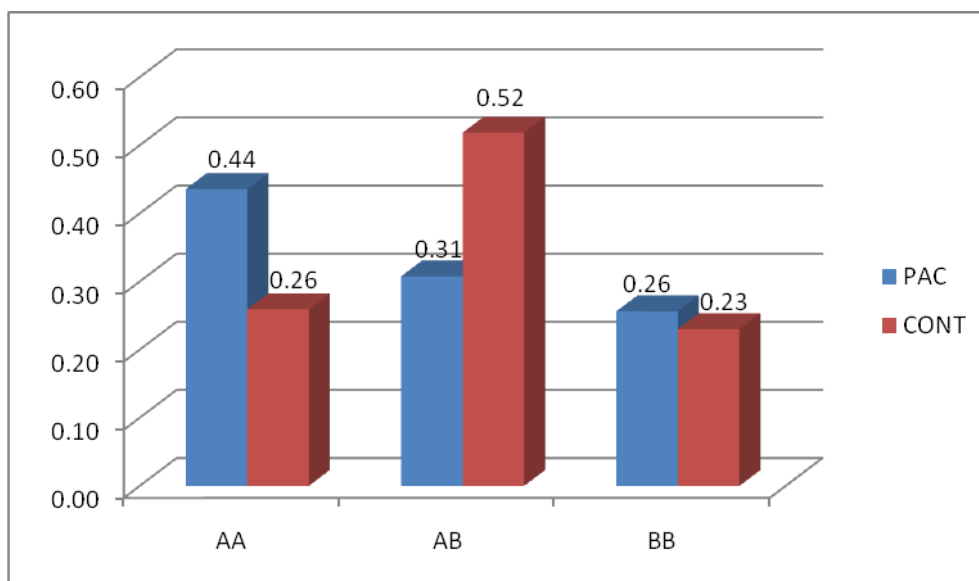
TABELA 19 Comparação da distribuição dos haplótipos A e B entre pacientes (N=39) e controles normais (N=136).

	PAC	CONT	p
Haplótipos	N (%)	N (%)	
AA	17 (44)	35 (26)	<b>0,0463</b>
AB	12 (31)	70 (52)	<b>0,0282</b>
BB	10 (26)	31 (23)	0,6689
<b>total</b>	<b>39</b>	<b>136</b>	

Comparação feita pelo teste exato de Fisher considerando um p bilateral. Demonstra que a amostra paciente possui uma frequência maior de AA e menor de AB do que a amostra controle, porém as frequências de BB são bastante similares.



GRÁFICO 13. Distribuição das freqüências dos haplótipos A e B entre pacientes (N=39) e controles normais (N=136).



#### 6.6. Interações *KIR* ligantes no subgrupo de pacientes com LMA

Na tabela 20, estão relacionadas as tipagens HLA com ênfase na tipagem *HLA-Cw* que permitiram as avaliações para transplantes haploidenticos da dupla doador e receptor ideal, considerando-se as interações *KIR* ligante

Adotando como critério a HLA-identidade entre paciente/doador e usando como referência a Família16/07 da Tabela 21, não foi encontrado o doador ideal para o paciente (HLA\*A24, HLA\*A02; HLA-B\*15, HLA-B\*41; HLA-DRB1\*09, HLA-DRB1\*04). Com base nas interações *KIR* ligantes seu doador ideal tanto seu pai quanto sua mãe por ambos apresentarem *mismatches HLA-Cw* (TABELA 22).

TABELA 20. Famílias com LMA

Tipagem Molecular										Mismatches				Haplótipos		Tip Molecular		Grupo ligante KIR						GvH		HvG	
Nº Família	Parentesco	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DQB1	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ	*A *B *DR	*A *B *DR	HLA-Cw	HLA-Cw	epit HLA-C	epit HLA-C	COMP LIG	COMP LIG	LIG B	LIG B	B	C	B	C
38	F 19/08	PAI	*03	*23	*38	*49	*11	*11		1	1	0		*23 *49 *11	*03 *38 *11	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw4	Bw4	M	M	M	MM
39	F 19/08	MAE	*23	*24	*13	*44	*03	*07		0	1	1		*24 *13 *07	*23 *44 *03	*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
37	F 19/08	PACIENTE	*23	*24	*13	*49	*07	*11	*0202	-	-	-	-	*24 *13 *07	*23 *49 *11	*06	*07	Cw6	Cw7	C2	C1	Bw4	Bw4	-	-	-	-
40	F 19/08	IRM01	*23	*23	*44	*49	*03	*11		0	1	1		*23 *44 *03	*23 *49 *11	*06	*07	Cw6	Cw7	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
41	F 19/08	IRM02	*23	*24	*13	*49	*07	*11	*0202	0	0	0	0	*24 *13 *07	*23 *49 *11	*06	*07	Cw6	Cw7	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
42	F 19/08	IRM03	*03	*24	*13	*38	*07	*11		1	1	0		*24 *13 *07	*03 *38 *11	*06	*12	Cw6	Cw12	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
43	F 19/08	IRM04	*23	*23	*44	*49	*03	*11		0	1	1		*23 *44 *03	*23 *49 *11	*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
57	F 16/08	PAI	*24	*29	*44	*51	*07	*08		0	1	1		*29 *44 *07	*24 *51 *08	*15	*16	Cw15	Cw16	C2	C1	Bw4	Bw4	M	MM	M	M
58	F 16/08	MAE	*02	*24	*18	*50	*03	*03		1	1	0		*24 *50 *03	*02 *18 *03	*05	*07	Cw5	Cw7	C2	C1	Bw6	Bw6	M	MM	MM	M
56	F 16/08	PACIENTE	*24	*29	*44	*50	*03	*07	*0201	-	-	-	-	*24 *50 *03	*29 *44 *07	*07	*16	Cw7	Cw16	C1	C1	Bw4	Bw4	-	-	-	-
59	F 16/08	IRM01	*02	*24	*07	*50	*01	*03		1	1	1		*24 *50 *03	*02 *07 *01	*07	*07	Cw7	Cw7	C1	C1	Bw6	Bw6	M	M	MM	M
60	F 16/08	IRM02	*02	*02	*15	*18	*03	*14		2	2	1		*02 *18 *03	*02 *15 *14	*03	*05	Cw3	Cw5	C1	C2	Bw6	Bw6	M	MM	MM	M
61	F 16/08	IRM03	*02	*29	*18	*44	*03	*07		1	1	0		*02 *18 *03	*29 *44 *07	*05	*16	Cw5	Cw16	C2	C1	Bw6	Bw4	M	MM	M	M
62	F 16/08	IRM04	*03	*24	*50	*51	*01	*03		1	1	1		*24 *50 *03	*03 *51 *03	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw6	Bw4	M	MM	M	M
63	F 16/08	IRM05	*02	*24	*18	*51	*03	*08		1	2	1		*02 *18 *03	*24 *51 *08	*05	*15	Cw5	Cw15	C2	C2	Bw6	Bw4	M	MM	M	MM
95	F 10/08	MAE	*01	*24	*08	*51	*03	*13		1	1	1		*24 *51 *13	*01 *08 *03	*07	*07	Cw7	Cw7	C1	C1	Bw6	Bw4	M	M	M	MM
94	F 10/08	PACIENTE	*24	*29	*07	*51	*01	*13	*0501	-	-	-	-	*24 *51 *13	*29 *07 *01	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
96	F 10/08	IRM01	*24	*29	*07	*51	*01	*13	*0501	0	0	0	0	*24 *51 *13	*29 *07 *01	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
97	F 10/08	IRM02	*24	*29	*07	*51	*01	*13	*0501	0	0	0	0	*24 *51 *13	*29 *07 *01	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
98	F 10/08	IRM03	*24	*29	*07	*51	*01	*13	*0501	0	0	0	0	*24 *51 *13	*29 *07 *01	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
99	F 10/08	IRM04	*24	*29	*07	*51	*01	*13	*0501	0	0	0	0	*24 *51 *13	*29 *07 *01	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
100	F 10/08	IRM05	*01	*29	*07	*08	*01	*03		1	1	0		*24 *51 *13	*29 *07 *01	*07	*15	Cw7	Cw15	C1	C2	Bw7	Bw8	M	M	MM	M
101	F 10/08	IRM06	*24	*26	*51	*57	*01	*13		1	1	1		*24 *51 *13	*26 *57 *01	*06	*07	Cw6	Cw7	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
107	F 07/08	PACIENTE	*02	*02	*35	*44	*07	*12	*0202	-	-	-	-	*02 *35 *12	*02 *44 *07	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw4				
108	F 07/08	IRM01	*02	*02	*35	*44	*07	*12	*0202	0	0	0	0	*02 *35 *12	*02 *44 *07	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
109	F 07/08	IRM02	*30	*68	*13	*35	*13	*14		2	1	2		*30 *13 *13	*68 *35 *14	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw4	Bw6	M	M	M	M
110	F 07/08	IRM03	*02	*02	*44	*50	*03	*07		0	1	2		*02 *50 *03	*02 *44 *07	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw4	Bw6	M	M	M	M
111	F 07/08	IRM04	*02	*68	*35	*35	*12	*14		1	0	1		*02 *35 *12	*68 *35 *14	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M
112	F 07/08	IRM05	*30	*68	*13	*35	*13	*14		2	1	2		*30 *13 *13	*68 *35 *14	*04	*18	Cw4	Cw18	C2	C2	Bw4	Bw6	M	M	M	M
113	F 07/08	IRM06	*02	*02	*35	*44	*07	*12	*0202	0	0	0	0	*02 *35 *12	*02 *44 *07	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
114	F 07/08	IRM07	*30	*68	*13	*35	*13	*14						*30 *13 *13	*68 *35 *14	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw4	Bw6	M	M	M	M
115	F 06/08	PACIENTE	*02	*33	*44	*53	*08	*11	*0301/19	-	-	-	-	*02 *44 *08	*33 *53 *11	*04	*05	Cw4	Cw5	C2	C2	Bw4	Bw4				
116	F 06/08	IRM01	*02	*11	*07	*44	*01	*04		1	1	2		*11 *07		*05	*06	Cw5	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
117	F 06/08	IRM02	*02	*33	*44	*53	*08	*11	*0301/19	1	1	0		*02 *44 *08	*33 *53 *11	*04	*05	Cw4	Cw5	C2	C2	Bw4	Bw4	M	M	M	M
118	F 06/08	IRM03	*32	*33	*50	*53	*08	*15		1	1	1		*32 *50		*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
119	F 06/08	IRM04	*02	*33	*44	*53	*08	*11	*0301/19	0	0	0		*02 *44 *08	*02 *44 *08	*04	*05	Cw4	Cw5	C2	C2	Bw4	Bw4	M	M	M	M

TABELA 20. Famílias com LMA (Continuação)

Tipagem Molecular										Mismatches				Haplótipos		Tip Molecular		Grupo ligante KIR						GvH		HvG		
Nº Família	Parentesco	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DQB1	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ	*A *B *DR	*A *B *DR	HLA-Cw	HLA-Cw	epit HLA-C	epit HLA-C	COMP LIG	COMP LIG	LIG B	LIG B	B	C	B	C	
125	F 04/08	PACIENTE	*03	*24	*44	*51	*07	*07	*0201/*0202	*0203/*0303	-	-	-	-	*03 *44 *07	*24 *51 *07	*04	*12	Cw4	Cw12	C2	C1	Bw4	Bw4				
126	F 04/08	IRM01	*03	*24	*44	*51	*07	*07	*0201/*0202	*0203/*0303	0	0	0	0	*03 *44 *07	*24 *51 *07	*04	*12	Cw4	Cw12	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
127	F 04/08	IRM02	*02	*24	*13	*51	*07	*11			1	1	1		*02 *13 *11	*24 *51 *07	*06	*15	Cw6	Cw15	C2	C2	Bw4	Bw4	M	M	M	MM
128	F 04/08	IRM03	*03	*24	*44	*51	*07	*07	*0201/*0202	*0203/*0303	0	0	0	0	*03 *44 *07	*24 *51 *07	*04	*12	Cw4	Cw12	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
129	F 04/08	IRM04	*02	*03	*13	*51	*07	*07			1	1	0		*02 *13 *11	*03 *51 *07	*06	*12	Cw6	Cw12	C2	C1	Bw4	Bw4	M	M	M	M
130	F 02/08	PACIENTE	*01	*68	*27	*35	*13	*16	*0502	*0603/28	-	-	-	-			*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1						
131	F 02/08	IRM01															*02	*04	Cw2	Cw4	C2	C2						
132	F 02/08	IRM02															*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1						
133	F 02/08	IRM03															*02	*04	Cw2	Cw4	C2	C2						
134	F 02/08	IRM04															*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1						
181	F 23/07	PAI	*02	*26	*50	*58	*07	*11						*02 *58 *11	*26 *50 *07	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4					
182	F 23/07	MÃE	*02	*11	*35	*3502	*11	*13						*02 *35 *11	*11 *35 *13	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	M	M	
180	F 23/07	PACIENTE	*02	*26	*35	*58	*11	*11			-	-	-	*02 *35 *11	*26 *58 *11	*06	*06	Cw6	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M	
183	F 23/07	IRM01	*02	*11	*35	*50	*07	*13						*11 *35 *13	*02 *50 *07	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M	
184	F 23/07	IRM02	*02	*26	*35	*58	*11	*11						*02 *35 *11	*26 *58 *11	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M	
185	F 23/07	IRM03	*02	*02	*35	*50	*07	*11						*02 *35 *11	*02 *50 *07	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M	
186	F 23/07	IRM04	*02	*26	*35	*58	*11	*13									*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
187	F 23/07	IRM05	*02	*02	*35	*50	*07	*11						*02 *35 *11	*02 *50 *07	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M	
188	F 23/07	IRM06	*11	*26	*35	*50	*07	*13						*11 *35 *13		*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M	
189	F 23/07	IRM07	*02	*11	*35	*50	*07	*13							*11 *35 *13	*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M	
190	F 23/07	IRM08	*02	*26	*35	*58	*11	*11									*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
191	F 23/07	IRM09	*11	*26	*35	*58	*11	*13									*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
192	F 23/07	IRM10	*02	*26	*35	*58	*11	*11									*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	M
193	F 23/07	IRM11	*02	*02	*35	*50	*07	*11									*04	*06	Cw4	Cw6	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	M
203	F 20/07	MÃE	*02	*15	*53	*53	*03	*07			1	2	1		*02 *53 *07	*15 *53 *03	*03	*04	Cw3	Cw4	C1	C2	Bw4	Bw4	M	M	M	M
202	F 20/07	PACIENTE	*02	*23	*15	*44	*03	*04			-	-	-		*23 *44 *04	*02 *15 *03	*03	*04	Cw3	Cw4	C1	C2	Bw6	Bw4				
204	F 20/07	IRM01	*01	*02	*08	*15	*03	*03			1	1	0		*01 *08 *03	*02 *15 *03	*03	*07	Cw3	Cw7	C1	C1	Bw6	Bw6	M	M	MM	MM
205	F 20/07	IRM02	*01	*02	*08	*15	*03	*03			1	1	0		*01 *08 *03	*02 *15 *03	*03	*07	Cw3	Cw7	C1	C1	Bw6	Bw6	M	M	MM	MM
206	F 20/07	IRM03	*01	*02	*08	*15	*03	*03			1	1	0		*01 *08 *03	*02 *15 *03	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw6	M	M	MM	MM
207	F 20/07	IRM04	*02	*23	*44	*53	*04	*07			0	1	1		*23 *44 *04	*02 *53 *07	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw4	Bw4	M	M	M	MM
208	F 20/07	FILHO01	*02	*30	*15	*49	*03	*11			1	1	1		*02 *15 *03	*30 *49 *11	*03	*07	Cw3	Cw7	C1	C1	Bw6	Bw4	M	M	M	MM
209	F 20/07	FILHO02	*23	*68	*35	*44	*04	*11			1	1	1		*23 *44 *04	*68 *35 *11	*04	*04	Cw4	Cw4	C2	C2	Bw6	Bw4	M	M	M	MM
210	F 20/07	FILHO03	*02	*30	*15	*49	*03	*11			1	1	1		*02 *15 *03	*30 *49 *11	*03	*07	Cw3	Cw7	C1	C1	Bw6	Bw4	M	M	M	MM
227	F 16/07	PAI	*24	*24	*15	*40	*09	*11			0	1	1		*24 *15 *09	*24 *40 *11	*16	*07	Cw16	Cw17	C1	C2	Bw6	Bw6	M	M	M	M
228	F 16/07	MÃE	*02	*29	*41	*44	*04	*07			1	1	1		*02 *41 *04	*29 *44 *07	*07	*16	Cw7	Cw16	C1	C1	Bw6	Bw4	MM	M	M	MM
226	F 16/07	PACIENTE	*02	*24	*15	*41	*04	*09			-	-	-		*24 *15 *09	*02 *41 *04	*07	*07	Cw7	Cw17	C1	C2	Bw6	Bw6				
234	F 13/07	PAI	*02	*23	*07	*15	*07	*10			1	1	1		*02 *07 *10	*23 *15 *07	*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1	Bw6	Bw6	M	M	M	M
235	F 13/07	MÃE	*02	*23	*35	*52	*03	*13			1	1	1		*02 *35 *03	*23 *52 *13	*04	*16	Cw4	Cw16	C2	C1	Bw6	Bw4	MM	M	M	M
233	F 13/07	PACIENTE	*02	*02	*07	*35	*03	*10			-	-	-		*02 *07 *10	*02 *35 *03	*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1	Bw6	Bw6	M	M	M	M
236	F 13/07	IRM01	*02	*02	*07	*35	*03	*10			0	0	0		*02 *07 *10	*02 *35 *03	*04	*07	Cw4	Cw7	C2	C1	Bw6	Bw6	M	M	M	M

Haplótipos			Mismatches				Protocolo
	*A *B *DR	*A *B *DR	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ	HLA
F 19/08							
PACIENTE	*24 *13 *07	*23 *49 *11	-	-	-	-	
PAI	*23 *49 *11	*03 *38 *11	1	1	0	-	
MAE	*24 *13 *07	*23 *44 *03	0	1	1	-	
IRM01	*23 *44 *03	*23 *49 *11	0	1	1	-	
IRM02	*24 *13 *07	*23 *49 *11	0	0	0	0	X
IRM03	*24 *13 *07	*03 *38 *11	1	1	0	-	
IRM04	*23 *44 *03	*23 *49 *11	0	1	1	-	
F 16/08							
PACIENTE	*24 *50 *03	*29 *44 *07	-	-	-	-	
PAI	*29 *44 *07	*24 *51 *08	0	1	1	-	
MAE	*24 *50 *03	*02 *18 *03	1	1	0	-	
IRM01	*24 *50 *03	*02 *07 *01	1	1	1	-	
IRM02	*02 *18 *03	*02 *15 *14	2	2	1	-	
IRM03	*02 *18 *03	*29 *44 *07	1	1	0	-	
IRM04	*24 *50 *03	*03 *51 *03	1	1	1	-	
IRM05	*02 *18 *03	*24 *51 *08	1	2	1	-	
F 10/08							
PACIENTE	*24 *51 *13	*29 *07 *01	-	-	-	-	
MAE	*24 *51 *13	*01 *08 *03	1	1	1	-	
IRM01	*24 *51 *13	*29 *07 *01	0	0	0	0	X
IRM02	*24 *51 *13	*29 *07 *01	0	0	0	0	X
IRM03	*24 *51 *13	*29 *07 *01	0	0	0	0	X
IRM04	*24 *51 *13	*29 *07 *01	0	0	0	0	X
IRM05	*24 *51 *13	*29 *07 *01	1	1	0	-	
IRM06	*24 *51 *13	*26 *57 *01	1	1	1	-	
F 07/08							
PACIENTE	*02 *44 *07	*02 *35 *12	-	-	-	-	
IRM01	*02 *44 *07	*02 *35 *12	0	0	0	0	X
IRM02	*68 *35 *14	*30 *13 *13	2	1	2	-	
IRM03	*02 *44 *07	*02 *50 *03	0	1	2	-	
IRM04	*68 *35 *14	*02 *35 *12	1	0	1	-	
IRM05	*68 *35 *14	*30 *13 *13	2	1	2	-	
IRM06	*02 *44 *07	*02 *35 *12	0	0	0	0	X
IRM07	*68 *35 *14	*30 *13 *13	2	2	2	-	
F 06/08							
PACIENTE	*33 *53 *08	*02 *44 *11	-	-	-	-	
IRM01	*11 *07	*02 *44	1	1	x	-	
IRM02	*33 *53 *08	*02 *44 *11	0	0	0	-	X
IRM03	*33 *53 *08	*32 *50 *15	1	1	1	-	
IRM04	*33 *53 *08	*02 *44 *11	0	0	0	-	X

Protocolo HLA indica os possíveis doadores HLA idêntico. IRM = irmãos dos pacientes; FILHO = filhos do paciente.

	2DL1	2DL2	KIR 2DL3	2DS1	2DS2	Tip Molecular HLA-Cw	HLA-Cw	Epítotos HLA-Cw	HLA-B	HLA-B	Grupo ligante KIR COMP LIG	COMP LIG	GvH B	GvH C	HvG B	HvG C	Protocolos Imcomp lig-KIR	HLA
<b>F 19/08</b>																		
<b>PACIENTE</b>	-	-	-	-	-	*06	*07	Cw6	Cw7	Bw4	Bw4	C2	C1	-	-	-	-	
PAI	1	0	1	1	1	*04	*06	Cw4	Cw6	Bw4	Bw4	C2	C2	M	M	M	MM	
MAE	0	1	0	1	1	*04	*07	Cw4	Cw7	Bw4	Bw4	C2	C1	M	M	M	M	
IRM01	1	0	1	0	0	*06	*07	Cw6	Cw7	Bw4	Bw4	C2	C1	M	M	M	M	
IRM02	1	0	1	0	1	*06	*07	Cw6	Cw7	Bw4	Bw4	C2	C1	M	M	M	M	X
IRM03	1	0	1	1	0	*06	*12	Cw6	Cw12	Bw4	Bw4	C2	C1	M	M	M	M	
IRM04	1	0	1	1	0	*04	*07	Cw4	Cw7	Bw4	Bw4	C2	C1	M	M	M	M	
<b>F 16/08</b>																		
<b>PACIENTE</b>	-	-	-	-	-	*07	*16	Cw7	Cw16	Bw4	Bw6	C1	C1	-	-	-	-	
PAI	1	0	1	0	0	*15	*16	Cw15	Cw16	Bw4	Bw4	C2	C1	M	MM	M	M	X
MAE	1	0	1	0	1	*05	*07	Cw5	Cw7	Bw6	Bw6	C2	C1	M	MM	MM	M	
IRM01	1	0	1	1	0	*07	*07	Cw7	Cw7	Bw6	Bw6	C1	C1	M	M	MM	M	
IRM02	1	0	1	0	0	*03	*05	Cw3	Cw5	Bw6	Bw6	C1	C2	M	MM	MM	M	
IRM03	1	0	1	0	0	*05	*16	Cw5	Cw16	Bw6	Bw4	C2	C1	M	MM	M	M	X
IRM04	1	0	1	0	0	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw6	Bw4	C1	C2	M	MM	M	M	X
IRM05	1	0	1	0	0	*05	*15	Cw5	Cw15	Bw6	Bw4	C2	C2	M	MM	M	MM	
<b>F 10/08</b>																		
<b>PACIENTE</b>	-	-	-	-	-	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw6	Bw4	C1	C2	-	-	-	-	
MAE	1	0	1	0	0	*07	*07	Cw7	Cw7	Bw6	Bw4	C1	C1	M	M	M	MM	
IRM01	1	0	0	0	0	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw6	Bw4	C1	C2	M	M	M	M	X
IRM02	1	0	1	0	0	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw6	Bw4	C1	C2	M	M	M	M	X
IRM03	1	0	1	0	0	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw6	Bw4	C1	C2	M	M	M	M	X
IRM04	1	0	1	0	0	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw6	Bw4	C1	C2	M	M	M	M	X
IRM05	1	0	0	0	0	*07	*15	Cw7	Cw15	Bw7	Bw8	C1	C2	M	M	MM	M	
IRM06	1	0	1	0	0	*06	*07	Cw6	Cw7	Bw4	Bw4	C2	C1	M	M	M	M	
<b>F 07/08</b>																		
<b>PACIENTE</b>	-	-	-	-	-	*04	*04	Cw4	Cw4	Bw6	Bw4	C2	C2	-	-	-	-	
IRM01	1	0	1	1	0	*04	*04	Cw4	Cw4	Bw6	Bw4	C2	C2	M	M	M	M	X
IRM02	1	0	1	1	1	*04	*06	Cw4	Cw6	Bw4	Bw6	C2	C2	M	M	M	M	
IRM03	1	0	1	0	0	*04	*06	Cw4	Cw6	Bw4	Bw6	C2	C2	M	M	M	M	
IRM04	1	0	1	1	0	*04	*04	Cw4	Cw4	Bw6	Bw6	C2	C2	M	M	MM	M	
IRM05	1	0	1	1	0	*04	*18	Cw4	Cw18	Bw4	Bw6	C2	C2	M	M	M	M	
IRM06	1	0	1	1	0	*04	*04	Cw4	Cw4	Bw6	Bw4	C2	C2	M	M	M	M	X
IRM07	1	0	1	1	0	*04	*06	Cw4	Cw6	Bw4	Bw6	C2	C2	M	M	M	M	
<b>F 06/08</b>																		
<b>PACIENTE</b>	-	-	-	-	-	*04	*05	Cw4	Cw5	Bw4	Bw4	C2	C2	-	-	-	-	
IRM01	1	1	1	0	1	*05	*06	Cw5	Cw6	Bw6	Bw4	C2	C2	M	M	M	M	
IRM02	0	1	0	1	1	*04	*05	Cw4	Cw5	Bw4	Bw4	C2	C2	M	M	M	M	X
IRM03	1	0	1	0	0	*04	*06	Cw4	Cw6	Bw6	Bw4	C2	C2	M	M	M	M	
IRM04	1	1	1	1	1	*04	*05	Cw4	Cw5	Bw4	Bw4	C2	C2	M	M	M	M	X

Grupo ligante *KIR* C1 = Lisina na posição 80 e C2 = Asparagina; GvH = Doença do enxerto vs paciente; HvG = Doença do paciente vs enxerto; Imcomp lig-KIR indica os possíveis doadores com *mismatches* para o ligante Bw ou C (C1 ou C2) na direção da GvH.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA

Um modelo de banco de dados com a descrição de características gerais dos pacientes com doenças hematopoiéticas do Serviço de Transplante do Hospital Erasto Gaertner e do seu núcleo familiar servirá como base de caracterização para estudos futuros.

O estabelecimento de um banco de dados sólido pelo grupo de pesquisa LIGH-UFPR e Hospital Erasto Gaertner possibilitará a comparação das informações observadas por outras Instituições de Saúde e Serviços de Transplantes de Células Progenitoras Hematopoiéticas no Brasil e em outros países, visando a otimização da escolha de doadores.

Um sistema de banco de dados estruturado fornece informações sobre a magnitude e o impacto do câncer, detecção precoce, tratamento e cuidados paliativos. Os registros de câncer de base populacional e hospitalares são parte desse sistema.

Para o estabelecimento de medidas efetivas de controle para Instituições de Saúde e Serviços de Transplante, fazem-se necessárias informações de qualidade sobre a distribuição de incidência e mortalidade, o que possibilita uma melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes; a formulação de hipóteses causais; a avaliação dos avanços tecnológicos aplicados à prevenção e ao tratamento, bem como a efetividade da atenção à saúde.

O estudo de características distributivas, como sexo, idade e grupo racial em pacientes com leucemia fornecem referência científica para prevenção e intervenção da doença (GAO et al., 2009).

Para recomendar um transplante de células progenitoras hematopoiéticas é necessário comparar o risco associado com a doença *versus* o procedimento do transplante que, depende do estágio da doença, da idade do paciente, do tempo de intervalo para o diagnóstico do transplante, do tipo do doador (irmãos ou doadores não relacionados), sexo do doador e características individuais (HOŁOWIECKI, 2008).

Tanto o transplante autólogo quanto o transplante alogênico fazem parte de um processo de tratamento para leucemias, linfoma e certas doenças menos comuns. Conseqüentemente, as indicações para TCTH sofrem mudanças, resultado de todos os avanços na prática médica. Os fatores de particular significância envolvem benefícios reconhecidos em situações específicas de transplante, melhor suporte no tratamento (drogas anti – infecciosas, preparações do sangue, condições de tratamento e a introdução de medicamentos alternativos na terapia de algumas doenças (HOŁOWIECKI, 2008).

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), dos cânceres infantis, a leucemia é o tipo mais freqüente, dentre essas, a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é de maior ocorrência em crianças na maioria das populações do mundo, com exceção do Japão, da China e do Zimbábue – países onde a LLA é menos freqüente que a Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Entre os linfomas, o mais incidente na infância é o linfoma não Hodgkin.

Embora a amostra fosse constituída por um número de pacientes pequeno foi concordante com dados divulgados pelo INCA que relaciona a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) como as doenças de base mais freqüentes associadas com alterações hematopoiéticas e com indicação de transplante

O programa de fiscalização, epidemiologia, e resultados finais do Instituto Nacional do Câncer é uma fonte de informação competente na incidência e na pesquisa do câncer nos Estados Unidos (<http://seer.cancer.gov>). Atualmente coleta e publica dados de incidência e sobrevivência do câncer em registros populacionais representando aproximadamente 26% da população dos Estados Unidos. Segundo dados do *National Cancer Institute-USA*, a incidência e taxas de mortalidade para leucemia linfóide aguda tem diminuído nos últimos anos.

A mortalidade do câncer na infância tem declinado para quase todos os cânceres na maioria de países industrializados. A probabilidade de uma sobrevivência de cinco anos tem melhorado entre 30% e 50% para cânceres na infância avaliados pelos registros europeus ao

comparar o período 1978-1982 ao período 1993-1997 (PRITCHARD-JONES et al., 2006). Recentemente a probabilidade de sobrevivência tem melhorado devido a regimes terapêuticos cada vez mais eficazes e altamente padronizados.

A incidência da leucemia foi observada geralmente por ser mais elevada em brancos e em homens (YAMAMOTO e GOODMAN, 2008). Disparidades étnicas foram observadas na maioria das formas de câncer adulto e algumas formas de câncer pediátrico, particularmente leucemia linfóide aguda (BHATIA et. al., 2002; CLEGG et. al., 2002).

A composição racial da amostra de 39 pacientes e familiares reflete a composição racial da região Sul do país onde há uma maior predominância populacional é do grupo racial Branco, que de acordo com IBGE é de 79,6%. Observamos 84% de pacientes como pertencentes a este grupo racial.

Estas associações são consistentes em vários tipos de leucemia, com exceção da LMC que tem uma incidência similar em brancos e em negros. Os asiáticos e os hispânicos foram relatados por terem as mais baixas taxas de leucemia, com taxas particularmente baixas de LLC em países asiáticos e entre Asiáticos nos Estados Unidos (YAMAMOTO e GOODMAN, 2008).

A leucemia linfóide aguda na infância é clinicamente heterogênea com subtipos prognosticamente e biologicamente distintos. Embora as diferenças raciais na freqüência de tipos diferentes de LLA na infância sejam relatadas, muitas são confundidas por amostras selecionadas ou limitadas da população. Um grupo de estudo de leucemia na Malásia e Cingapura investigou a freqüência em subgrupos de uma grande amostra de crianças asiáticas de diversas etnias, com um total de 299 pacientes. O estudo sugere uma importante e significativa diferença racial na freqüência em subtipos de crianças com LLA (ARIFFIN et al., 2007).

A sobrevivência total parece não diferir entre grupos étnicos na Grã Bretanha (MCKINNEY et al., 1999; SPALLEK et al., 2008), com uma exceção possível da leucemia linfóide aguda com probabilidade mais baixa de sobrevivência entre crianças britânicas de origem étnica sul



asiático. Nos Estados Unidos, há uma evidência em oposição a respeito das diferenças étnicas na probabilidade da sobrevivência após leucemia linfóide aguda na infância (PUI et al., 1995; BHATIA, 2004). Para a leucemia mielóide aguda a probabilidade da sobrevivência de crianças negras e latino-americanas nos Estados Unidos é mais baixo do que em crianças brancas (APLENC et. al., 2006).

PUI e colaboradores (1995) encontraram resultados mais baixos em pacientes negros quando comparados a pacientes brancos, sendo observado um risco próximo ao dobro de infecção relacionada a mortalidade em pacientes negros. Ainda, um número menor que o esperado de crianças negras encontrou doadores relacionados ou doadores no núcleo familiar (APLENC et al., 2006)

A causa desta diferença é desconhecida, os pesquisadores supõem que a conformidade com terapia, acesso aos recursos dos cuidados médicos, diferenças no fenótipo da doença, aceitação de terapias tais como a transfusão e o transplante e variações farmacogenéticas podem ter um papel no resultado do tratamento.

HAN e colaboradores (2008) conduziram uma análise detalhada de sobrevivência em casos de neoplasmas linfóides diagnosticados no período de 1973-2003 em Registros de Fiscalização, Epidemiologia e Resultados Finais de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde. A investigação indicou que brancos não-hispânico apresentaram tipicamente taxas mais elevadas de sobrevivência comparadas aos negros, com exceção do mieloma múltiplo (HAN et al., 2008).

A maior taxa de sobrevivência foi observada entre pacientes jovens com linfoma de Hodgkin, e a menor taxa de sobrevivência foi observada entre casos de neoplasma, particularmente leucemia de células do plasma, em todos os grupos raciais (HAN et al., 2008).

Uma análise de sobrevivência por grupos raciais em pacientes que realizaram TCTH em uma única instituição dos Estados Unidos entre julho 1992 e dezembro 2000 indicou que o grupo racial não estava associado significativamente com a sobrevivência em pacientes que receberam TCTH autólogo (MIELCAREK et al., 2005 ). Ao contrário,

entre pacientes que realizaram TCTH alogênico de doadores HLA-compatíveis não relacionados ou de irmãos, os negros tiveram uma frequência significativamente maior na mortalidade quando comparados aos brancos. A mortalidade entre outros grupos raciais não foi significativamente diferente daquela observada entre brancos.

Inúmeros estudos indicam que homens são mais suscetíveis a desenvolverem alguns tipos de leucemias do que as mulheres. <http://seer.cancer.gov/>. (Acesso 05 de abril de 2009).

De acordo com estimativas do INCA para o ano de 2008, das taxas brutas de incidência (TBI) por 100 mil e de números de casos novos de leucemias no Brasil espera-se que (TBI: 5,22) 5 220 homens e (TBI: 4,44) 4 320 mulheres manifestem a doença. As mesmas estimativas projetaram para o ano de 2008 para o Estado do Paraná (TBI: 6,81) 360 homens e (TBI: 5,08) 270 mulheres e (TBI: 7,23) 60 homens e (TBI: 6,57) 60 mulheres para Curitiba, respectivamente. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> (Acesso 05 de abril de 2009).

A comparação da distribuição dos pacientes em relação ao sexo (cálculos não demonstrados), ainda que com valores de  $p$  não significativo ( $X^2 = 3.10$  ;  $Gl=1$ ), mas próximos ao limiar de significância, sugeriu uma tendência de um maior número de pacientes do sexo masculino, apresentando doenças hematológicas: 64%(25) pertencentes ao sexo masculino vs 36% (14) pertencentes ao sexo feminino, fornecendo mais uma evidência de que doenças hematológicas estariam mais comumente associadas ao sexo masculino.

Em 2006, MOLICA realizou estudos observacionais em pacientes com leucemia linfóide crônica constatando uma incidência reduzida e uma sobrevivência superior para pacientes do sexo feminino. Estes resultados corroboravam com relatórios nacionais de base de dados de câncer diferentes sendo confirmados em investigações recentes. Entretanto, os fatores determinantes que conduzem a uma sobrevivência superior em mulheres são desconhecidos, sugere-se uma melhor resposta e/ou tolerância da terapia nas mulheres ou uma diferença intrínseca na biologia molecular da doença ou uma combinação de ambos os fatores (MOLICA, 2006).

Um estudo em pacientes com leucemia do programa de doadores de medula chinesa realizado por GAO e colaboradores (2009), no período de 2000 a 2006, constatou que a maioria de pacientes foi registrada entre crianças e adolescentes, sendo que a maior incidência foi encontrada em homens (GAO et al., 2009).

No período de 1973 a 2003 um estudo de padrão de sobrevivência nos Estados Unidos, indicou que homens tiveram tipicamente as mais baixas taxas de sobrevivência do que as mulheres, mas o oposto foi observado para a leucemia de Burkitt entre indivíduos não pertencentes ao grupo racial branco e mieloma múltiplo entre brancos não-hispânicos (HAN et al., 2008).

Nos Emirados Árabes a distribuição e a incidência da leucemia aguda entre janeiro 2000 e dezembro 2006 em pacientes com idade mediana de 34 anos indicou uma frequência (32%) mais elevada do que em países ocidentais. Isto reflete claramente a estrutura da população que consiste em homens predominantemente jovens. Entre os pacientes LMA, uma incidência mais elevada foi encontrada entre mulheres nacionais do que em homens (HASSAN et al., 2009). Este resultado é contraditório ao que a literatura tem publicado onde a LMA e a LLA são mais comuns em homens. A explicação para tais dados implicam em fatores de risco cumulativos que as mulheres do estudo referido se expõem, como a deficiência da vitamina D em consequência da privação da luz solar e da exposição direta aos produtos químicos de benzeno e do realce da cor do henna, não devem ser excluídos em posterior investigação.

Estudos futuros que avaliem os prognósticos moleculares, genéticos e clínicos conhecidos permitirão um melhor entendimento destas diferenças e determinará se o tratamento deve ser associado aos perfis clínicos biológicos ou mais ao sexo.

A média de idade para diagnóstico da leucemia linfóide aguda foi de 13 anos no período de 2002-2006. Aproximadamente 60.8% foi diagnosticada com idade inferior a 20 anos; 10.1% entre 20 e 34; 6.5% entre 35 e 44; 6.4% entre 45 e 54; 5.8% entre 55 e 64; 5.1% entre 65 e

74; 3.8% entre 75 e 84; e 1.5% 85 anos ou mais de idade (HASSAN et al., 2009).

As taxas de sobrevivência declinam com a idade no diagnóstico entre pessoas idosas (HAN et.al., 2008). Publicações recentes de dados internacionais de mortalidade e de incidência indicam que a mortalidade total da leucemia declinou drasticamente entre crianças e aumentou entre as pessoas idosas (GROVES et al., 1995; KWIATKOWSKI, 1994). Houve um aumento substancial de cinco anos na sobrevivência relativa para a leucemia entre crianças desde meados dos anos 70, com uma pequena melhora entre outros grupos de idade nos Estados Unidos.

Membros de um grupo de estudo de câncer investigou crianças britânicas de um centro de oncologia pediátrica durante o período de 1981a1996 e a taxa de sobrevivência é relativamente uniforme através dos grupos étnicos onde o câncer é a principal causa de morte em pacientes de 1 a14 anos (STILLER et al.,2000).

A média de idade de idade dos pacientes com LLA foi de 15, 2 anos, a mais baixa entre as demais doenças de bases (TABELA 7). Concordando com dados publicados na literatura que apresentaram uma incidência maior da LLA em crianças.

Um estudo epidemiológico foi realizado com ênfase em tendências de tempo baseado no registro nacional polonês em câncer no período 1963-1990. Durante um período de 28 anos, a incidência da leucemia aumentou três vezes na faixa etária 70-80+ anos, havendo neste mesmo período um aumento na classe etária 50-69 anos. Nos 11 anos finais de estudo a leucemia aguda apresentou um aumento em todos os grupos de idade, principalmente na faixa etária de 70-80+ anos. A incidência da leucemia mielóide crônica aumentou somente na classe etária 70-80+ anos (KWIATKOWSKI, 1994) .

A ocorrência da maioria dos tipos de leucemia aumenta com idade, com a exceção da LLA. Os estudos de tendências da idade em todos os quatro tipos adultos principais de leucemia foram limitados aos brancos e aos negros. As taxas de leucemia na infância sugerem tendências étnicas diferentes daquelas descritas em todos os grupos de idade (YAMAMOTO e GOODMAN, 2008), sustentando a necessidade

de estudos dos subtipos de leucemia por classe etária em diversas populações.

Inúmeras avaliações pelo subtipo da leucemia identificam diferenças importantes em padrões geográficos, raciais/étnicos, de idade, sexo, sugerindo que os subtipos possam ter fatores etiológicos diferentes (GROVES et.al., 1995). Possíveis explicações incluem variações étnicas no metabolismo da droga, na susceptibilidade à infecção ou na conformidade com terapia. Diversas características ou tendências específicas dos subtipos de doenças hematológicas possibilitam uma posterior investigação. Por isso, um sistema de banco de dados dos pacientes será uma ferramenta valiosa para pesquisas futuras, ampliando caminhos para comparações com outros laboratórios de transplantes e, o mais importante, otimizando a escolha do doador.

## 7.2 FREQUÊNCIAS DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS GENES *KIR* NOS PACIENTES.

Neste trabalho foi avaliada o repertório de genes *KIR* em pacientes com doenças hematopoiéticas. De um modo geral, as frequências da presença/ausência dos genes *KIR* foram semelhantes (TABELA 9) às frequências observadas em populações européias, o que seria de se esperar considerando-se a predominância de Brancos euro-descendentes na região Sul do Brasil.

Os genes de moldura *KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2* se mostraram presentes em todas as amostras pois é consenso que estejam presentes em todos os haplótipos *KIR* conhecidos. Os demais genes *KIR* inibidores e ativadores restantes apresentaram frequências que variavam entre os indivíduos.

Devido à ligação funcional entre as moléculas HLA de classe I e *KIRs* é esperado um polimorfismo elevado. Estudos com genes *KIR* em populações diferentes, juntamente com avaliações do sistema HLA

podem fornecer informações valiosas sobre a história e a geografia de genes nas populações humanas (UHRBERG et al., 2002; TONEVA et al., 2001).

Em uma avaliação da distribuição dos genes *KIR* em um grupo representativo da população italiana, três populações foram marcadamente distintas do estudo realizado por BONTADINI e colaboradores (2006), os aborígenes australianos, chineses Han e japoneses. Particularmente os genes inibidores *KIR2DL2* e ativadores *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR3DS1* apresentaram diferenças significativas quando comparados com as frequências observadas na população italiana (BONTADINI et al., 2006). Corroborando com outras avaliações realizadas em populações caucasianas (WITT et al., 1999; JIANG et al., 2004; YAWATA et al., 2002).

A distribuição de frequências dos genes *KIR* nos pacientes (TABELA 9) demonstrou uma frequência baixa para os genes *KIR2DL2* (23%), *KIR2DL5* (28%), *KIR2DS1* (15%), *KIR2DS3* (13%), *KIR2DS5* (28%) e *KIR3DS1* (26%). Embora a amostra representativa dos pacientes seja pequena, a baixa frequência de alguns genes é observada em populações de origem caucasiana.

Os genes inibidores *KIR2DL2* e *KIR2DL5B*, igualmente, foram encontrados em frequências extremamente baixas na amostra representativa da população italiana, assim como o gene ativador *KIR2DS3* (BONTADINI et al., 2006). Interessantemente, os chineses Han demonstraram um padrão exatamente inverso para os alelos *KIR2DS4* quando comparados aos italianos (JIANG et al., 2005).

Os genes *KIR* que apresentaram frequência elevada no grupo dos pacientes foram: *KIR2DL1* (90%), *KIR2DL3* (92%), *KIR2DP1* (95%), *KIR2DS4* (92%) e *KIR3DL1* (93%).

Um desequilíbrio de ligação positivo elevado foi observado no grupo da população italiana para os genes *KIR2DL1* e *KIR2DL3*, como detectados em outras populações caucasianas e não-caucasianas. Estas referências sugerem uma segregação de haplótipos na região dos genes *KIR* em dois grupos distinguidos por *KIR2DL1/KIR2DL3* e *KIR2DL2*, embora evidências tenham indicado que o *KIR2DS2* seja

resultado de um evento de recombinação entre *KIR2DL1* e *KIR2DL3* (WILSON et al., 2000).

Um estudo da distribuição de genes e pseudogenes *KIR* na população iraniana foram comuns a distribuição de frequência em populações caucasianas realizadas em estudos prévios. Os genes mais freqüentes a exceção dos genes de moldura foram *KIR2DL1*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e o pseudogene *KIR2DP1*. Entretanto, apresentaram um aumento ou diminuição de frequências originais em diversos locos (TAJIK et al., 2009).

Diversos estudos têm investigado a frequência de genes *KIR* em pacientes com doenças hematológicas malignas (ZHAO et al., 2008). A maioria destas investigações tem sido realizadas em pacientes com doenças de base distintas, como LMA, LMC E MDS (RUGGERI et al., 1999; ELMAAGACLI et al., 2005; SCONOCCHIA et al., 2005; KHAKOO e CARRINGTON, 2006; SCHELLEKENS et al., 2008).

Investigações precedentes têm demonstrado que os genes *KIR* estão envolvidos na patogênese de inúmeras doenças, incluindo a artrite reumatóide (YEN et al., 2001), psoríase (MARTIN et al., 2002), diabetes mellitus tipo 1 (VAN DER SLIK et al., 2003), e vírus da hepatite C (KHAKOO et al., 2004).

Avaliações com associação de doenças indicam um papel para interações entre os locos *KIR* e *HLA* e doenças infecciosas, doenças auto-imunes/inflamatórias, câncer e reprodução (KULKARNI et al., 2008).

Embora a distribuição de ambos os grupos de haplótipos, A e B, varia consideravelmente entre grupos étnicos têm sido encontrado em todas as populações analisadas até o momento (UHRBERG et al., 2002; SHILLING et al., 2002; HSU et al., 2002). A associação de genes *KIR* tem sido observada a eventos pós transplante alogênico, evidenciando o papel dos genes *KIRs* no resultado no transplante de células hematopoiéticas (RUGGERI et al., 2002).

Quando comparamos pacientes com as duas doenças de base mais freqüentes na amostra, LMA e LLA (TABELA 11), os resultados indicaram uma diferença significativa para o gene *KIR2DS3* ( $p= 0,0031$ ), sendo que pacientes com LMA apresentaram positividade maior para

este gene quando comparados aos pacientes LLA. Embora o tamanho da amostra seja relativamente pequena, recentes publicações apontam importantes papéis de genes *KIR* específicos influenciando resultados no TCTH alogênico entre irmãos HLA compatíveis, GvHD, relapsos e demais complicações relacionadas ao transplante (KIM et al., 2007), em amostras heterogêneas (MIDDLETON et al., 2009) e igualmente pequenas.

Um estudo realizado na China investigou genótipos *KIR* em 54 pacientes com doenças malignas hematopoiéticas, classificados em dois grupos de risco: padrão e alto. A frequência de genes *KIR* ativadores no grupo de risco padrão foi mais alta quando comparada ao grupo de alto risco, especificamente para os genes *KIR2DS1*, *KIR2DS2* e *KIR3DS1*. Uma análise secundária deste estudo foi realizada em pacientes LMA do grupo de risco padrão e grupo de alto risco. O primeiro grupo apresentou frequências de genes *KIR* mais altas comparadas ao último grupo, particularmente para os genes *KIR2DS1*, *KIR2DS2* e *KIR2DS3* (ZHAO et al., 2008).

Pesquisadores coreanos investigaram a influência dos genes *KIR* em pacientes LMA e seus pares de doadores irmãos HLA compatíveis após TCTH. Todos os genes ativadores *KIR* nos doadores foram importantes para determinar o resultado de maneiras distintas para cada gene estudado, sendo determinantes importantes da GvHD aguda em TCTH para leucemia mielóide aguda (KIM et al., 2007).

Particularmente, o gene *KIR2DS2* e o alelo *KIR2DS4\*003* foram correlacionados com a GvHD aguda. Esta evidência sugere uma especificidade imunogenética na população coreana comparada aos caucasianos, uma vez que a frequência dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DS2* são comparativamente menores em coreanos que em outros países. O gene *KIR2DS1* esteve associado a uma melhor sobrevivência em longo prazo mesmo se presente somente no doador e não no receptor. A dupla de genes *KIR2DS3-KIR2DS5* foi envolvida mais frequentemente em uma variedade de complicações relacionadas ao transplante. (KIM et al., 2007).



A presença de determinados receptores *KIR* pode ter um efeito protetor específico para doenças de bases distintas como foi evidenciado recentemente em uma investigação na Turquia em um grupo de pacientes leucêmicos heterogêneos e um grupo controle, indicando um efeito protetor contra LMC na presença de *KIR2DL2* e/ou *KIR2DS2* (MIDDLETON et al., 2009).

AHLENSTIEL (2008) e WINTER (1998), juntamente com seus colaboradores exemplificaram interações entre *HLA-Cw* e inibidores *KIR2D* onde *KIR2DL1/HLA-C2* (e provavelmente *KIR2DL2/HLA-C1*) parece conferir respostas inibidoras mais fortes do que *KIR2DL3/HLA-C1* (AHLENSTIEL et al., 2008 e WINTER et al., 1998).

Resultados interessantes foram observados quando comparamos dados dos pacientes com resultados de genotipagem *KIR* de controles normais, constituído de 136 indivíduos da população paranaense, obtidos em estudo anterior e disponíveis no banco de dados do Grupo de Pesquisa do LIGH. Apesar de doenças de base distintas e uma amostra pequena é um dado importante. Demonstrando a importância de uma posterior investigação com uma amostra maior de pacientes.

A comparação do repertório *KIR* entre pacientes e indivíduos controles normais pertencentes ao banco de dados do LIGH (TABELA 10), revelou que os genes inibidores ***KIR2DL2* ( $p=0,0005$ )** e ***KIR2DL5* ( $p=0,0067$ )**, bem como os genes ativadores ***KIR2DS1* ( $p=0,0013$ )**, ***KIR2DS2* ( $p=0,0038$ )**, ***KIR2DS3* ( $p=0,0153$ )** apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p<0,05$ ).

Da mesma forma quando comparamos o repertório *KIR* entre irmandades e indivíduos controles normais observamos que os genes inibidores ***KIR2DL1* ( $p=0,0171$ )** e ***KIR2DL2* ( $p=0,0000$ )**, bem como os genes ativadores ***KIR2DS2* ( $p=0,0001$ )**, ***KIR2DS3* ( $p=0,0018$ )**, ***KIR2DS3* ( $p=0,0012$ )** apresentaram diferenças significativas ( $p<0,05$ ). Estes dados podem ser observados na tabela 14.

Também a comparação do repertório *KIR* entre pais e indivíduos controles normais do banco de dados do LIGH observamos que os genes inibidores ***KIR2DL2* ( $p=0,0078$ )**, bem como os genes ativadores ***KIR2DS2* ( $p=0,0466$ )**, ***KIR2DS3* ( $p=0,0274$ )**, apresentaram diferenças

estatísticas também significativas ( $p < 0,05$ ). Estes dados podem ser observados na tabela 17.

Diversos estudos de associações a doenças indicam um papel para interações entre locos *KIR* em doenças infecciosas, doenças autoimune/inflamatórias, câncer e reprodução. Dados funcionais suportam um mecanismo baseado em uma contínua inibição e ativação em doenças através de vários genótipos *KIR-HLA* (KULKARNI et al., 2008).

Torna-se cada vez mais claro que a força de interações *HLA-KIR* tem um significado funcional e pode influenciar a susceptibilidade da doença. Os dados de associações a doenças acumulados até o momento, indicam que diferenças nas interações são significativas em determinar o resultado à infecção (KHAKOO e CARRINGTON, 2006; PARHAM, 2005).

Até o momento, estudos relatados indicam que as combinações *HLA-KIR* com potencial forte de ativação são protetoras ao vírus HIV e, o locus *KIR3DL1/KIR3DS1*, decididamente é o ponto mais importante nesta consideração (KULKARNI et al., 2008).

Os genótipos *KIR-HLA* implicam igualmente no resultado à infecção do vírus da Hepatite C. Dados precedentes sugerem que *KIR2DL1/HLA-C2* podem conferir respostas inibidoras mais fortes do que *KIR2DL3/HLA-C1* (WINTER et al., 1998; AHLENSTIEL et al., 2008). Quando indivíduos foram contaminados com uma inoculação viral de baixo-dose, a combinação genotípica de *KIR2DL3/HLA-C1*, que conduz teoricamente a sinais inibidores mais fracos e, conseqüentemente a um potencial mais baixo de ativação, foi protetora em termos de afastamento espontâneo do vírus (KHAKOO et al., 2004). Em 2008, ROMERO e colaboradores, realizaram outro estudo que igualmente implicou em um papel protetor para o *KIR2DL3* (ROMERO et al., 2008).

Associações *KIR* com susceptibilidade a condições auto-imunes e inflamatórias apontam a cauda curta de *KIR* ativadores. *KIR* ativadores são evolucionariamente mais recentes, provavelmente originaram-se de homólogos inibidores (ABI-RACHED e PARHAM, 2005). Uma extensa variação é observada dentro das frequências *KIR* ativadoras através de

diversas populações étnicas (SINGLE et al., 2007), mas a diversidade alélica é completamente limitada em comparação aos receptores inibidores (HOU et al., 2008). As frequências fenotípicas de *KIR* ativadores e seus ligantes mostram correlações negativas fortes através das populações, contrastando a correlações positivas fracas entre vários genes *KIR* inibidores e seus ligantes (SINGLE et al., 2007). Estes dados sugerem pressões seletivas para manter consistentemente baixa frequência dos receptores de ativação correspondentes de *KIR* e de seus ligantes, provavelmente em parte devido às pressões de seleção de doenças auto-imunes.

Diversas condições que envolvem dano vascular e inflamação mostraram associação com o *KIR2DS2* (KULKARNI et al., 2008). A frequência de *KIR2DS2* foi aumentada em pacientes com Artrite Reumatóide com vasculite quando comparados a controles normais e em pacientes sem vasculite (YEN et al., 2001).

Polimorfismos de genes *KIR* podem estar associados à susceptibilidade à infecção ou proteção ao vírus da Hepatite B. Isto foi observado em uma investigação realizada em pacientes com Hepatite B crônica, controles recuperados espontaneamente e adultos saudáveis, do Hospital provincial Shandong e do Hospital de doença infecciosa Jinan, no período de outubro 2004 e agosto 2006. ZHI-MING e colaboradores (2007) sugerem que os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS3* foram genes de susceptibilidade ao vírus da Hepatite B, induzindo a uma persistente, embora fraca reação inflamatória que conduziu a danos contínuos nos tecidos vivos e a hepatite crônica. Por outro lado, os genes *KIR2DS1*, *KIR3DS1*, e *KIR2DL5*, podem ter efeito protetor contra o vírus da Hepatite B (ZHI-MING et al., 2007).

As células *NK* participam na imunidade inata contra células tumorais ou células infectadas por vírus com expressão anormal de moléculas HLA classe I. Tem sido relatado que as células leucêmicas podem ter baixa expressão de moléculas HLA de classe I e, em algumas situações uma perda completa do alelo HLA de classe de I (DEMANET et al., 2004; VOLLMER et al., 2003). Aparentemente, as células *NK* destes pacientes não podem destruir estas células leucêmicas e

permitem que estas células malignas escapem do controle imune inato. Esta falha pode ser devido ao fato que estas células *NK* fazem parte de clones malignos e, conseqüentemente tenham uma diminuição de função (CHIOREAN et al., 2003). Uma hipótese alternativa poderia ser que estes pacientes possuem um genótipo de receptores *NK* incapaz de destruir células leucêmicas com expressão aberrante de moléculas HLA I.

No presente estudo, 16 receptores *NK* em 39 pacientes com doenças hematológicas foram comparados com 136 controles saudáveis do Paraná. A freqüência dos genes *KIR* observados em nosso controle não diferiu substancialmente da freqüência relatado previamente em outras populações Caucásicas (dados não mostrados) (UHRBERG et al., 2002; WITT et al., 1999; TONEVA et al., 2001; NORMAN et al., 2001; NIOKOU et al., 2003; CRUM et al., 2000.). Interessantemente, determinados genes *KIR* apresentaram freqüências significativamente diferentes nos pacientes com doenças hematológicas quando comparados aos controles saudáveis.

O *KIR2DL4*, os inibidores *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e o pseudogene *KIR3DP1* estiveram presentes em 100% dos pacientes e controles saudáveis, em conformidade com a maioria de estudos populacionais anteriormente publicados (UHRBERG et al., 1997; WITT et al., 1999; TONEVA et al., 2001; NORMAN et al., 2001; NIOKOU et al., 2003; CRUM et al., 2000; RAJALINGAM et al., 2002). O inibidor *KIR3DL1* foi positivo em quase a totalidade da amostra dos pacientes (95%). Uma freqüência significativamente mais elevada do *KIR2DL2* foi observada no grupo total dos pacientes comparado ao controle ( $p=0,0005$ ), como demonstrado na TABELA 10. Devido a um desequilíbrio positivo forte entre *KIR2DL2* e *KIR2DS2*, observou-se uma freqüência elevada do *KIR2DS2* no grupo de pacientes ( $p=0,0038$ ).

A ausência de expressão de moléculas MHC de classe I em tumores acumula evidência para papel de *NK* na eliminação de células transformada.

Níveis mais elevados de inibição mediada por *KIR* pode facilitar o escape do tumor, como foi demonstrado para o melanoma onde o

genótipo composto *KIR2DL2/KIR2DL3/HLA-C1* foi mais freqüente em pacientes em comparação aos controles (NAUMOVA et al., 2005).

Genótipos *KIR* ativadores podem ter efeitos opostos em malignidades distintas dependendo se a inflamação é ou não o componente principal da patogênese do tumor. Ao contrário, de efeitos de susceptibilidade de genótipo *KIR-HLA* inibidores em câncer no qual o componente inflamatório não tem nenhum papel aparente na patogênese, observaram-se que genótipos *KIR-HLA* eram fortemente inibidores sendo realmente protetores contra a neoplasia cervical (CARRINGTON et al., 2005).

O *KIR3DS1* tem efeito protetor contra o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em pacientes com infecção crônica do vírus da hepatite C (LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2005), provavelmente devido a presença de inflamação no desenvolvimento carcinoma hepatocelular em alguns casos.

A expressão anormal de genes *KIR* foi associada com várias condições malignas. *KIR* inibidores são expressos igualmente em subconjuntos de células T na leucemia linfocítica granular (MORICE et al., 2003) e condições mais severas da doença foram associadas com a ausência de ligantes HLA para *KIRs* expressos (NOWAKOWSKI et al., 2005).

A capacidade de células *Natural Killer (NK)* em lisar espontaneamente células tumorosas e sua potente atividade citotóxica antileucêmica *in vitro*, sugerem funções importantes para estas células na resposta imune antileucêmica *in vivo* (TRINCHERI, 1989; LOTZOVA et al., 1987).

A identificação de fenótipos associados à leucemia em pacientes belgas indicou freqüências significativamente mais elevadas de *KIR* inibidores, *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*, entre pacientes leucêmicos, e têm sugerido que podem contribuir a uma falta de respostas antitumorosas de *NK* ou de LTC em células renais cancerosas (VERHEYDEN et al., 2004).

Em um estudo realizado em 35 pacientes com um tipo doença linfoproliferativa de *NK*, os genes inibidores *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B*

foram mais freqüentes nos pacientes quando comparados com o controle saudável (SCQUIZZATO et al., 2007).

O vírus Epstein-Barr é o principal fator ambiental associado com o Linfoma de Hodgkin's, comum em adultos jovens. As *NK* são ferramentas chaves da resposta imune inata contra o vírus. BESSON e colaboradores (2007) identificaram em um estudo familiar um efeito protetor de *KIR3DS1/KIR2DS1* mais forte em pacientes com Linfoma de Hodgkin's e o vírus Epstein-Barr foi detectado em células do sangue ou do tumor (BESSON et al., 2007).

Um total de 50 pacientes chineses Han foram investigados para explorar a correlação entre os genes *KIR* e a suscetibilidade a leucemia. A comparação com indivíduos controle saudáveis indicaram que os genes *KIR3DL1* e *KIR2DL1* apresentaram freqüências significativamente mais baixas que o grupo controle. Havendo uma possível correlação negativa entre a patogênese da leucemia e os genes *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, *KIR2DL1* e *KIR2DL5* (Chen et al., 2007). Demonstrando que o polimorfismo *KIR* está associado com a suscetibilidade à leucemia em Hans.

Neste estudo, embora a amostra de pacientes necessite ser aumentada para confirmação dos resultados, os pacientes apresentaram freqüências mais baixas de *KIR3DS1* (26% versus 39%) e *KIR2DL5* (28% versus 53%) quando foram comparados ao controle.

Uma forte ligação positiva entre os genes *KIR3DL1* e *KIR2DS4* foi observada em uma investigação na Bélgica em pacientes leucêmicos e na população controle (VERHEYDEN et al., 2004). Esta observação poderia estar relacionada à alta freqüência de *KIR3DL1* encontrada em quase a totalidade dos pacientes leucêmicos.

Análises de genes *KIR* revelaram o *KIR2DS3* como um fator protetor para GVHD crônica em transplante com doadores HLA compatíveis não relacionados (MCQUEEN et al., 2007) e com doadores que têm mais de quatro *KIR* ativadores em transplantes haploidênticos.

Evidências para funções distintas e complementares resultam de estudos que correlacionam genes *KIR* com parâmetros de saúde humana e de doença, em que as associações observadas foram em sua

grande maioria com grupos *KIR* ativadores. As células *NK* eram componentes previamente não reconhecidos no processo de rejeição de TCTH e na GvHD.

O aumento da amostra neste estudo para uma investigação posterior sugere que a susceptibilidade à leucemia possa ser influenciada ao menos em parte pelos receptores *KIR*. Uma porcentagem relevante de pacientes leucêmicos expressa receptores *NK* com capacidade inibidoras favorecendo o escape do controle das *NK*.

O estudo de receptores *KIR* em pacientes com doenças hematológicas são cruciais para compreensão dos mecanismos subjacentes na disfunção de *NK* na leucemia.

Caracterizar o perfil genético de pacientes e seu núcleo familiar reúne informações relevantes que permitirão investigações robustas sobre genes *KIR* e sua influencia em importantes doenças tais como Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Linfóide Aguda entre outras.

### 7.3 GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS

Análises de genótipos *KIR* têm revelado que freqüências relativas distintas de haplótipos A e B distinguem determinadas populações étnicas. O haplótipo A é predominante na população caucasiana, africana e japonesa. Na população caucasóide, aproximadamente um terço dos indivíduos exibem o genótipo do grupo A, já a população japonesa o genótipo do grupo A são encontrados em freqüências acima de 50% (MARTIN et al., 2004; YAWATA et al., 2002).

A literatura tem relatado a freqüência de 34% de genótipos homozigotos AA em populações Caucasóides (TONEVA et al, 2001); 57% em populações Senegalesas (DENIS et al., 2005); e 58.7% em populações Chinesas (JIANG et al, 2005) o que sugere uma nítida diferença na distribuição desses haplótipos quando se considera a ancestralidade e grupos étnicos.

Um grande número de genótipos *KIR-HLA* tem sido envolvido na patogênese de doenças e na resistência às infecções virais, doenças auto-imunes, doenças inflamatórias e câncer (KULKARNI et al., 2008).

O conjunto de genes *KIR* e o locus HLA de classe I são extraordinariamente diversos, conduzindo à hipótese que as respostas imunes de células *NK* estão predeterminadas geneticamente em alguma extensão (PARHAM, 2005). Isto é suportado por observações epidemiológicas recentes em que genótipos *KIR/HLA* com suposto perfil de ativação, isto é, com presença de *KIR* ativadores ou falta de *KIRs* inibidores ou seus respectivos ligantes, são genótipos que conduzem teoricamente a uma baixa inibição e mais elevada ativação parece ser benéfica em infecções virais tais como o vírus de imunodeficiência humana (HIV) (JENNES et al., 2006) e resistência ao vírus da hepatite C (KHAKOO et al., 2004), e uma progressão mais lenta da doença de HIV (MARTIN et al., 2002.), e a melhor aptidão reprodutiva (HIBY et al., 2004). Por outro lado, genótipos de ativação constituem um risco para a susceptibilidade à auto-imunidade, tal como a psoríase/artrite psoriática (HOLM et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005.), diabetes tipo I (NIKITINA et al., 2004), e o escleroderma (MOMOT et al., 2004), e, provavelmente ao câncer que possui um componente inflamatório à patogênese da doença.

Diversas condições que envolvem dano vascular e inflamação demonstram associação com *KIR2DS2*. As células T  $CD4^+CD28^-$ , que são expandidas na artrite reumatóide (RA) e causam dano endotelial, foram encontradas por expressar *KIR2DS2* na ausência do inibidor *KIR2DL2* nesta circunstância (NAMEKAWA et al., 2000). A frequência de *KIR2DS2* foi aumentada em pacientes RA com vasculite em comparação com controles normais e em pacientes com artrite reumatóide sem vasculite (YEN et al., 2001).

Associações *KIR-HLA* com manifestações clínicas distintas na Artrite Reumatóide (MAJORCZYK et al., 2007) incluem o genótipo de *KIR2DL3+/KIR2DS3-*, presente em pacientes que foram diagnosticados precocemente, e os genes *KIR2DS1* e *KIR3DS1* tiveram uma frequência mais elevada em pacientes com erosões ósseas. *KIR2DL2/KIR2DS2*



apresentaram freqüências significativamente elevadas em pacientes com manifestações extra-articular, incluindo vasculite (MAJORCZYK et al., 2007). *KIR2DS2* na ausência de *KIR2DL2* (genes que estão em desequilíbrio de ligação positivo forte) igualmente foi observado por ser aumentado entre pacientes com escleroderma (MOMOT et al.; 2004).

Neste estudo cada genótipo foi dado uma possibilidade combinatória dos haplótipos de acordo com o modelo de HSU e colaboradores (2002), atribuindo genes aos haplótipos conhecidos. Como relatado previamente, 18 genótipos foram encontrados nos pacientes, incluindo 12 genótipos não encontrados e nomeados por esta referência (TABELA 12). O genótipo com freqüência mais elevada foi AF, AG ou AJ (44%). Este genótipo possui um único ativador, o *KIR2DS4*, cinco inibidores, *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR3DL1* e *KIR3DL2*, dois pseudogenes, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*, totalizando nove genes *KIR*, sendo que o *KIR2DL4* não foi contabilizado em nenhum dos grupos de genes ativadores ou inibidores.

O alvo de um estudo que explorou a possibilidade de herança de genótipos e haplótipos *KIR* como candidatos para susceptibilidade à infecção persistente do vírus da hepatite B ou a proteção contra o vírus na população chinesa Han, encontrou 32 genótipos, incluindo 15 novos genótipos não observados em caucasianos até o momento (KUMMEE et al., 2007). Nos controles saudáveis, os três genótipos com freqüência mais elevada foram: AJ (25,00%), AF (22,57%) e AH (14,56%). Em Pacientes com Hepatite B crônica, os genótipos, AJ (19,33%), G (16,00%) e AF (16,00%) foram os três genótipos mais elevados. Em pacientes controles espontaneamente recuperados, os genótipos AH (21,12%), G (15,94%) e AJ (15,14%) foram os três principais genótipos. ZHI-MING e colaboradores (2007) sugerem que haja freqüências distintas de genótipos *KIR* na população chinesa Han na área de Shandong. Baseado nos resultados deste estudo foi proposto que genótipos e haplótipos que contêm mais genes de ativação possam ter um papel importante na infecção ou na proteção contra o vírus da Hepatite B (ZHI-MING et al., 2007).

A amostra de pacientes apresentou uma frequência maior de indivíduos homozigotos AA, os quais são indivíduos com um número reduzido de locos ativadores. Enquanto que a amostra controle possui uma frequência maior de indivíduos AB, os quais possuem um número maior de ativadores devido ao haplótipo B.

No que se refere à distribuição e comparações de genótipos entre pacientes e controles, observamos que os homozigotos AA e heterozigotos AB apresentaram diferenças significantes.

Uma investigação de genótipos *KIR* e das suas frequências em chineses demonstrou a distribuição de alta frequência de um único polimorfismo de genes *KIR*. A combinação com frequência mais elevada nas populações chinesas, japonesas, coreanas e caucasianas foi *KIR-2DL1-2DL3-2DL4-3DL1-3DL2-3DL3-2DS4*. Este estudo fornece indícios para um melhor prognóstico do transplante de rim, uma alternativa do uso de agentes imunossupressores pelo aumento ou inibição da função de células *NK* (FU et al., 2009).

O genótipo mais freqüente nos pacientes com doença hematológicas igualmente continha um único ativador, *KIR2DS4*, indicando que o caminho de transdução de sinal inibidor tem um papel importante na função das células *NK*.

A comparação de combinações *KIR* na população chinesa Han com populações japonesas, coreanas e caucasianas identificou 8.93% das combinações *KIR* eram compartilhadas por todas estas populações; chineses, coreanos e caucasianos compartilharam 5.36% de combinações *KIR* comuns, visto que somente 1.79% de combinações comuns foram encontradas em chineses e caucasianos (FU et al., 2009).

O genótipo *KIR* de 35 pacientes com doença linfoproliferativa de *NK* e de 50 indivíduos controle normais foram investigados para avaliar genes que codificam *KIR* ativadores, a análise revelou que o mesmo genótipo *KIR* foi compartilhado por um número variável de pacientes. Interessantemente, os genótipos recorrentes observados no grupo paciente não foram encontrados nos controles. Os genes inibidores, *KIR2DL5a* e *KIR2DL5b* foram detectados mais freqüentemente nos pacientes do que nos controles (SCQUIZZATO et al., 2007). Os

pacientes e, surpreendentemente, os genótipo dos controles *KIR* consistiram preferencial no haplótipo B caracterizados pela presença de múltiplo *KIR* ativadores.

Em um outro estudo de frequência de genes *KIR* específicos na população chinesa Han do norte em pacientes com doenças hematológicas vinte e dois genótipo diferentes foram encontrados (DOU et al., 2008). O genótipo mais comum foi *KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2*. Com os genótipos restantes observados entre 2 a 40 vezes. Interessantemente, nenhum destes genótipos não haviam sido encontrados nos caucasianos por HSU e colaboradores (2002).

Genótipos do grupo A onde os indivíduos são homozigotos para os dois haplótipos do grupo A, apresentaram frequências extremamente altas (51,9%) pacientes chineses Han com doenças hematológicas, similar aos japoneses (56%), mas apenas 28,3% dos caucasianos exibem o genótipo do grupo A (NIOKOU et al., 2003; MARTIN et al., 2004; WHANG et al.;2005).

A distinção entre o efeito dos genótipos compostos por *HLA-C2/KIR2DL1* e *HLA-C1/KIR2DL3* no resultado de várias doenças tem sido previamente relatadas e atribuídas à ativação diferencial das *NK* (KHAKOO et al., 2004; CARRINGTON et al.,2005; BUTSCH KOVACIC et al., 2005; HAWES e KIVIAT, 2002; KHAKOO e CARRINGTON, 2006).

Níveis mais elevados de inibição mediada por receptores *KIR* podem facilitar o escape do tumor, como foi evidenciado para o melanoma onde o genótipo composto *KIR2DL2/2DL3/HLA-C1* foi mais freqüente em pacientes quando comparados aos controles (NAUMOVA et al., 2005) e *KIR3DL1/Bw4 80I* foi mais elevado em pacientes com melanoma metastática (NAUMOVA et al., 2007).

Genótipos *KIR* de ativação podem ter efeitos opostos em distintas malignidades dependendo da inflamação ser ou não o componente principal da patogênese do tumor. Ao contrário dos efeitos de susceptibilidade de genótipos inibidores *KIR-HLA* em câncer em que o componente inflamatório não tem nenhum papel aparente na patogênese, observou-se que genótipos fortemente inibidores de *KIR*-

*HLA* realmente eram protetores à neoplasia cervical (CARRINGTON et al., 2005). Será importante determinar se resultados consistentes são observados em outros cânceres que envolvem claramente a inflamação na patogênese, tal como o câncer gástrico e o câncer de colo.

Trabalhos recentes sugerem que o genótipo *KIR* pode afetar o resultado de TCTH. Sendo assim, é muito importante o estudo da distribuição do genótipo *KIR* na população. Na população, a diversidade para o genótipo *KIR* resulta da combinação do conteúdo variável do gene e do polimorfismo alélico dentro do locus *KIR*.

O sistema imune adotou uma estratégia de imensa diversidade, exemplificada pelo MHC, cujo conteúdo variável dos genes e o polimorfismo alélico combinam-se para individualizar o genótipo HLA. Como o HLA, a região *KIR* está emergindo rapidamente como uma região igualmente diversa que utiliza estratégias evolucionárias similares do conteúdo de gene variável e do polimorfismo para conseguir diversidade similar (UHRBERG et al.; 1997; NORMAN et al; 2005). Estudos iniciais revelaram variações no conteúdo de genes *KIR* de indivíduo para indivíduo, cujas combinações dos genes *KIR* corresponderam a dois grupos de haplótipos *KIR*, A e B. Estes estudos do conteúdo do gene foram estendidos a análises populacionais, que revelaram ainda uma grande diversidade dos genótipos *KIR*, ainda suportados pelo modelo dos dois grupos de haplótipos gerais (PARHAM et al., 2003).

O número de locus *KIR* pode variar entre indivíduos resultado de uma disposição heterogênea de possíveis genes *KIR*. Os perfis observados devem-se a ocorrência de duas famílias de haplótipos denominadas A e B, que podem ser distinguidas baseadas em determinadas seqüências *KIR*. Análises imunogenéticas de diversas populações étnicas demonstraram diferenças significativas em termos de distribuição haplogrupos A e B (DOU et al., 2008).

No presente estudo, observamos uma maior freqüência de haplótipos A nos grupos analisados. Entre os 39 pacientes observamos 59% haplótipos A vs 41% haplótipos B; na irmandade 62% vs 38% e

entre os pais, 57% vs 43%, respectivamente como pode ser observado no Gráfico 12.

No que se refere a distribuição dos haplótipos A e B, para a população do Estado do Paraná em estudos prévios realizados por nosso grupo observamos que as frequências estimadas dos haplótipos A e B foram respectivamente 63% e 37%, respectivamente (VARGAS et al., 2009 submetido). Esses resultados foram similares aos observados em algumas populações Caucasoídes tais como: populações francesas e finlandesas 65% haplótipo A e 35% haplótipo B, (DENIS et al., 2005) e Britânicas 70% haplótipo A e 30% haplótipo B (COOK et al, 2003). Populações afro-descendentes apresentam frequências mais elevadas do haplótipo A quando comparadas com populações Caucasoídes, isto é 72% para o haplótipo A e 28% para o haplótipo B. O haplótipo A possui uma frequência de 75% em Japoneses e apenas 15% em Aborígenes Australianos (TONEVA et al., 2001; YAWATA et al., 2002).

Uma investigação da diversidade de genes *KIR* em pacientes com doenças hematológicas na população chinesa Han indicou que a frequência de haplótipos do grupo A em relação ao grupo B foi de aproximadamente 3:1, sendo que mais de 50% dos indivíduos eram homozigotos para o haplótipo A (DOU et al., 2008).

O haplótipo A é o mais comum haplótipo *KIR* em todas as populações do mundo inteiro. A homozigosidade para este haplótipo é encontrado em 30% de indivíduos brancos e 56% dos indivíduos japoneses (NORMAN et al., 2002). Além disso, no mundo inteiro quase todos os haplótipos *KIR* contêm *KIR2DL1* junto com *KIR2DL3* ou *KIR2DL2*.

O desequilíbrio de ligação negativo ocorre para genes que sejam alelos ou apareçam raramente no mesmo haplótipo (NORMAN et.al., 2004). Interessantemente, em caucasianos o *KIR2DL2* e *KIR2DL3* raramente aparecem no mesmo haplótipo, mas em chineses estão positivamente associados.

Em um estudo de associação com famílias de receptores *KIR* e Linfoma de Hodgkin's, os genes *KIR2DS1* e *KIR2DS4* estavam em perfeito desequilíbrio de ligação negativo, ou seja, a presença de um

gene em um haplótipo excluía a presença do outro gene, com somente dois haplótipos observados, *KIR2DS1*<sup>+</sup>/*KIR2DS4*<sup>-</sup> e *KIR2DS1*<sup>-</sup>/*KIR2DS4*<sup>+</sup>. Os genes *KIR2DL2* e *KIR2DS2* estavam em perfeito desequilíbrio positivo com apenas haplótipos *KIR2DL2*<sup>+</sup>/*KIR2DS2*<sup>+</sup> e *KIR2DL2*<sup>-</sup>/*KIR2DS2*<sup>-</sup> observados (BESSON et al., 2007). Estes resultados são inteiramente consistentes com relatos prévios de haplótipos (HSU et al., 2002), possibilitando a determinação genotípica completa destes quatro *KIRs*. As frequências de três principais haplótipos *KIR*, A1 (46%), A2 (12%) e B (42%), foram estimados destes dados das famílias. Consistentes com frequências dos haplótipos A e B relatadas em outras populações de origem européia (DENIS et al., 2005; UHRBERG et al., 2002).

Os dois haplótipos significativamente associados com um efeito protetor ao Linfoma de Hodgkin's (H2 e H5) continham os mesmos alelos para *KIR3DS1* (+), *KIR2DL5* (+), *KIR2DS1* (+), e *KIR2DS4* (2), mas alelos diferentes para *KIR2DS5* (+ e 2, respectivamente). Os pesquisadores deste estudo indicaram dois haplótipos protetores H2 e H5 não continha *KIR2DS4*, visto que o haplótipo associado ao risco (H1) continha a forma deletada, resultando na produção de uma proteína truncada com ausência de efeito funcional (HSU et al., 2002; MAXWELL et al., 2002). Finalmente, os haplótipos H3 e H4 que continham alelos *KIR2DL5* diferentes, demonstraram efeitos opostos, embora esta diferença não fosse significativa. Assim, estes resultados sugerem que o efeito protetor ao Linfoma de Hodgkin's seja mediado pela presença de *KIR3DS1* ou *KIR2DS1* ou ambos os genes.

A análise realizada por MCQUEEN e colaboradores (2007) em pacientes do centro médico da Universidade de Stanford no período de março 1995 e março 2005, indicou que aproximadamente 28% dos doadores (56/202) e 30% dos receptores (61/202) pertenciam ao genótipo *KIR* AA, o restante possuía pelo menos um haplótipo B. Estas porcentagens são consistentes com frequências de genótipos *KIR* observadas em outras populações caucasianas (NORMAN et al., 2001; UHRBERG et al., 2002).

A combinação de haplótipos *KIR* no doador e no receptor tem demonstrado uma influência no resultado de TCTH. Notavelmente, haplótipos do grupo B no genótipo dos doadores pode ser prejudicial no resultado do transplante para leucemia mielóide, visto que haplótipos do grupo B no genótipo do receptor pode ser benéfico (MCQUEEN et al., 2007). A combinação doador BB ou AB e de receptor AA foi igualmente um fator de risco para o relapso e GVHD aguda após transplante para leucemia mielóide. Os resultados sugerem que quando os haplótipos do grupo B estavam correlacionados com a aGVHD, os genes individuais podiam fornecer proteção contra a cGVHD.

Em populações humanas há um balanço variável entre os haplótipos *KIR* do grupo A e B, mantidos por seleção balanceadora para funções inibidoras e ativadoras (UHRBERG et al., 1997; UHRBERG et al., 2002). Em parte esta seleção é mediada pela interação de *KIRs* inibidores e seus ligantes HLA de classe I. Como consequência a frequência do forte ligante inibidor, C2, é inversamente correlacionada com a frequência dos haplótipos do grupo A, em que os receptores inibidores são predominantes. Observou-se um risco elevado de pré-eclampsia na gravidez com mães AA e fetos homozigotos C2, deve-se a uma inibição excessiva de células *NK* expressando receptores *KIR* pelo trofoblasto fetal expressando C2. Uma característica inesperada deste reconhecimento do feto haploidêntico por linfócitos maternos é sua indiferença caso a mãe igualmente expresse C2 (HIBY et al., 2004). Em um significado imunológico convencional, o próprio era sem importância; o que importava era a extensão a que ligantes HLA de classe de HLA I poderiam ligar *KIR* inibidores em linfócitos maternos.

Este tipo de reconhecimento igualmente pertence ao TCTH, como indicado pelos resultados de estudos que seguiram o trabalho em transplantes haploidênticos (COOK et al., 2004; HSU et al., 2005). Caso a avaliação do genótipo *KIR* seja para causar algum impacto na seleção do doador para TCTH então não poderia ser uma seleção estrita, devido a já imposta compatibilidade HLA. Por este motivo, e por causa do significado biológico das diferenças dos haplótipos de A/B influenciando em resultados clínicos. Os genótipos *KIR* poderiam auxiliar na seleção

de doadores, particularmente para doadores não relacionados, e auxiliar a melhora dos resultados no transplante.

Todas essas observações e comparações referentes a distribuição de frequências da presença/ausência dos genes *KIR*, frequências haplotípicas e genótípicas entre pacientes, irmandades, pais e controles mostraram-se instigantes por sugerir a influência de prováveis genes associados a susceptibilidade de doenças hematológicas. Além disso, motiva que se investigue o balanço entre genes *KIR* ativadores e inibidores presente no repertório dos pacientes, pois como pode ser observado, estes pacientes apresentaram pelo menos 3 genes ativadores em seu repertório com diferenças estatísticas altamente significativas. Tais achados merecem ser interpretados com ampliação do tamanho amostral em novos estudos investigativos.

#### 7.4 MODELO INCOMPATIBILIDADE *KIR*- LIGANTE

A hipótese do “*missing self*” proposto por KARRE e colaboradores (KARRE et al., 1986) a mais de uma década atrás para explicar a regulação da ativação das células *NK* através de seus receptores inibidores foi testado com diversos resultados em pacientes que se submeteram a TCT alogênico (RUGGERI et al., 2002; GIEBEL et al., 2003; BEELEN et al., 2005; COOK et al., 2004). O modelo da incompatibilidade *KIR*-ligante prevê aloreatividade de *KIR* inibidores das células *NK* de doadores em situação clínica, onde a disparidade HLA entre doadores e receptores cumpre o critério da hipótese do “*missing self*” (RUGGERI et al., 1999; RUGGERI et al., 2002; PARHAM e MCQUEEN, 2003). Os genótipos *KIR* e HLA segregam independentemente, entretanto, existe a possibilidade de células *NK* exibirem receptores *KIR* para os quais não existem ligantes HLA, e, inversamente, para indivíduos que exibem ligantes HLA para os quais não há receptor *KIR* correspondente.



O efeito da falta de ligantes HLA para *KIR* inibidores tem sido foco da investigação em outras doenças, tais como doenças autoimunes e hepatite C. Uma associação clara da falta de ligante *HLA* para *KIR* inibidores em pacientes com artrite psoriática e o desenvolvimento da doença, particularmente quando receptores *KIR* ativadores *KIR2DS1* e *KIR2DS2*, estiveram igualmente presentes, conduziram os autores à conclusão que a combinação de sinais ativadores com a falta da inibição de células *NK* nestes pacientes desequilibra o balanço de regulação de *NK*, favorecendo um estado de reatividade (NELSON et al., 2004). Na Hepatite C uma relação entre o genótipo *HLA* e *KIR* inibidores demonstrou uma probabilidade de proteção ao vírus (KHAKOO et al., 2004). Com exceção do transplante alogênico, a única situação clínica em que a aloreatividade de *NK* pode ocorrer com frequência previsível é durante a gravidez na interface materno-fetal. Um estudo recente que examinou *KIR* materno e HLA fetal propôs que a inibição de *NK* através do acoplamento de HLA fetal ao receptor *KIR2DL1* materno favorece o desenvolvimento da pré-eclampsia (HIBY et al., 2004). Estes estudos evidenciam a importância de examinar genótipos HLA e *KIR* em estudos com células *NK* e doenças.

Neste estudo, na tentativa de otimizar a escolha de um doador no núcleo familiar de pacientes do Hospital Erasto Gaertner e, sua implementação em estudos futuros do LIGH com acompanhamento de pacientes pós transplante, um modelo teórico foi desenvolvido com o grupo de pacientes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda (n=11) para a escolha paciente/doador com base na incompatibilidade *KIR*-ligante. Os resultados da genotipagem *KIR* do núcleo familiar e genótipos *HLA-Cw* do paciente foram confrontados, (Tabela 21 e Tabela 22), baseando-se em relatos da literatura específica que esse grupo de pacientes, transplantados com doador haploidêntico (*mismatches* HLA), beneficiam-se do fenômeno imune do Enxerto versus Leucemia (GVL: *Graf versus Leukemia*).

Na tabelas 20 constam dados dos 11 pacientes e seu núcleo familiar: tipagem molecular dos locos *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*, número de *mismatches* para os locos tipados, os

haplótipos quando possíveis foram inferidos, assim como os grupos de ligantes *KIR* para prever a HvG ou GvH. Este último foi calculado através de uma ferramenta de pesquisa disposta denominada *KIR Ligand Calculator* (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>). Uma vez, que estratégias recentes de transplante baseadas na incompatibilidade da combinação *KIR*-ligante para prever a aloreatividade de células *NK* conduziram a menos relapso, menos casos de GvHD e melhoram a sobrevivência total nos pacientes com LMA (RUGGERI et al., 1999), um modelo de incompatibilidade *KIR*-ligante foi feito no presente estudo, comparando a escolha de um doador dentro das famílias com o protocolo HLA já utilizado em nosso laboratório e um protocolo *KIR* não utilizado e não padronizado.

Clinicamente a aloreatividade das células *NK* pode ser afetado por muitas variáveis, levando-se em consideração apenas o Protocolo HLA que indica os possíveis doadores HLA idênticos (**tabela 21**), cinco famílias foram analisadas 19/08, 16/08, 10/08, 07/08 e 06/08, com exceção do paciente da família 16/08, todos os pacientes encontraram pelo menos um doador HLA compatível. Em uma segunda etapa, estas cinco famílias foram analisadas pelo protocolo *KIR*, este modelo leva em consideração a incompatibilidade *KIR*-ligante. O paciente da família 16/08 que não havia encontrado um doador HLA compatível pelo Protocolo HLA, por meio do Protocolo *KIR* (TABELA 22) obteve três possíveis doadores, o pai e dois irmãos. Futuras investigações com as famílias de pacientes do Hospital Erasto Gaertner neste sentido, possibilitarão a implementação de um protocolo adicional baseado na incompatibilidade, otimizando, desta forma, a escolha dos doadores.

O impacto da falta ligantes *KIR* em TCT para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Síndrome Mielodisplásica (MDS) esta em conformidade com a maioria de trabalhos na literatura científica (RUGGERI et al., 2002; BEELEN et al., 2005; GIEBEL et al., 2003; HSU et al., 2005), mas não todos os respectivos relatórios precedentes (HSU et.al, 2006).

As células *NK* são consideradas uma população potente de células efectoras que contribuem para o efeito enxerto versus leucemia

(GvL), observado especificamente em transplante haploidentical para as leucemia mielóide (RUGGERI et al., 2002; PASSWEG et al., 2005).

A probabilidade mais elevada de sobrevivência encontrada em pacientes LMA e MDS que faltam ligantes HLA para *KIR* inibidores dos doadores sustentam resultados precedentes de efeitos antileucêmicos em LMA, mas não em transplante haploidentico em LLA (RUGGERI et al., 2002; GIEBET et al., 2003). Há evidências que os estágios avançados de LMC podem ser mais suscetíveis a um efeito de *NK* conduzido pela falta do ligante *KIR*.

Conforme, CLAUSEN e colaboradores, um risco reduzido de relapso em pacientes que se submeteram ao TCTH entre irmãos HLA-idêntico foi observado quando houve falta de pelo menos um ligante *HLA-B* ou *HLA-C* para um *KIR* inibidor presente no doador (CLAUSEN et al., 2007). Ainda, no conjunto da falta de pelo menos dois ligantes para *KIR* presentes no doador, que incluem *HLA-A3* e *HLA-A11* (por exemplo, o *KIR3DL2* não é inibido), além da falta de ligantes *HLA-B* e *HLA-C*, a incidência de relapso foi reduzida significativamente. Em pacientes com LMA ou MDS, o benefício trazido pela falta de ligantes indicou uma sobrevivência superior.

Estudos precedentes demonstraram claramente que a composição celular quantitativa de células tronco hematopoiéticas do enxerto, chamadas células CD34<sup>+</sup>, células T e uma dose total de células nucleadas têm um impacto no resultado após o Transplante de Medula Óssea (TMO) ou Transplante de Células Tronco do Sangue Periférico (TCTSP) para doenças hematológicas (ROCHA et al., 2002; CAO et al., 2005).

Além disso, os dados publicados sugerem que a influência da composição do enxerto depende da fonte de células tronco, medula óssea *versus* sangue periférico (HEIMFELD, 2003; SINGHAL et al., 2000), o protocolo de acondicionamento, padrão mieloablastivo *versus* intensidade reduzida de acondicionamento (PEREZ-SIMON et al., 2003; DIEZ-CAMPELO et al., 2005) e tipo de doador, irmão HLA idêntico *versus* doador alternativo (HEIMFELD, 2003; REISNER et al., 2000). Devido à maioria de estudos precedentes centrarem-se no impacto da

contagem de células CD34<sup>+</sup> (ZAUCHA et al., 2001; SINGHAL et al., 2000; PEREZ-SIMON et al., 2003; DIEZ-CAMPELO et al., 2005), pouco se conhece a respeito da associação entre o enxerto contendo células *NK* após TCTH.

Pouca informação existe sobre o impacto da dose de células *NK* no resultado após o transplante HLA-idêntico entre irmãos (SCHMITZ et al., 2002; YAMASAKI et al., 2003). Um mecanismo pelas quais células *NK* podem contribuir para o efeito GvL baseia-se na hipótese 'missing self' de KARRE e colaboradores (KARRE et al., 1986). Um número de estudos retrospectivos investigaram o efeito da (in) compatibilidade de *KIR*/ligante *HLA* em transplantes haploidênticos (RUGGERI et al., 2002; BISHARA et al., 2004), assim como em não relacionado, TCT *HLA*-incompatíveis (BEELEN et al., 2005; GIEBEL et al., 2003; DAVIES et al., 2002; HSU et al., 2006; FARAG et al., 2006) e TCT *HLA*-idêntico entre irmãos (COOK et al., 2004; HSU et al., 2006).

Os resultados são parcialmente conflitantes provavelmente às diferenças em protocolos de transplante assim como uma inconsistente definição de incompatibilidade *KIR*. Pois a expressão de *KIRs* não é estritamente dependente do tipo *HLA* do indivíduo (GUMPERZ et al., 1996; FROHN et al., 1997), ambos, *KIRs* inibidores com falta de ligante *HLA* apropriado ('missing *KIR* ligand') assim como epítomos *HLA* sem o respectivo *KIR*, podem ocorrer em um indivíduo (DUPONT e HSU, 2004). De acordo com HSU e outros, a falta do ligante *KIR* em TCTH *HLA*-idêntico demonstrou um efeito protetor contra o relapso nos casos de leucemia mieloide aguda (LMA) e Síndrome mielodisplásica (SMD) (HSU et al., 2005).

O estudo de HSU e colaboradores em TCTH entre irmãos *HLA* idênticos demonstrou que mais de 60% de pares doador-receptor exibiam falta de ligante *KIR* no receptor, conduzindo a um aumento de sobrevivência e diminuição no relapso em pacientes LMA e SMD, sugerindo um possível efeito de dose da falta do ligante *KIR*, tais que a falta de ambos, ligantes *HLA-B* e *HLA-C* para *KIR* inibidor do doador conduz a uma elevada probabilidade de sobrevivência comparado a falta de qualquer um sozinho.

Em uma investigação posterior de HSU e colaboradores com TCTH com doadores não relacionados e ligantes *KIR* influenciando a previsão de relapso, a diminuição do relapso em pacientes LMA foi similar a pacientes com LMC e LLA. Os receptores homozigotos para epítomos *HLA-B* e *HLA-C* são prováveis fatores com caráter de previsão de relapso da leucemia após TCH mieloblastivo de doadores não relacionados HLA compatíveis. Este efeito não foi observado em transplantes não relacionados HLA idênticos (HSU et al., 2006).

Evidências para funções distintas e complementares dos receptores *KIR* vem de estudos que correlacionaram fatores *KIR* com parâmetros de saúde humana e de doença, em que as associações observadas foram na maior parte com grupos de *KIRs* ativadores (PARHAM, 2005). Em TCTH uma variedade de associações *KIR* tem sido observada. O aumento da aGvHD foi correlacionado com o doador *KIR2DS3* em transplante não relacionado HLA-compatíveis e com doadores com mais de quatro *KIR* ativadores em transplantes haploidênticos (BISHARA et al., 2004; GAGNE et al., 2002). Ao contrário, DE SANTIS relatou aumento na sobrevivência e diminuição na aGvHD quando o doador tinha mais *KIR* que o receptor (DE SANTIS et al., 2005), em uma situação em que a maioria de *KIRs* adicionais seriam do tipo ativadores. Mais recentemente, SUN e outros correlacionaram o aumento da aGvHD em transplante não relacionado HLA-compatível para LMA quando o receptor tinha mais *KIR* inibidores do que o doador e/ou quando o doador tinha mais *KIR* ativadores do que o receptor (SUN et al., 2005). Finalmente, a diminuição do relapso em transplantes HLA-compatíveis para LMA, LMC e LLA foram correlacionados aos doadores que eram positivos para *KIR2DS1* e *KIR2DS2* (VERHEYDEN et al., 2005).

Devido ao extensivo desequilíbrio de ligação no locus *KIR* torna-se difícil separar os efeitos devido a genes *KIR* individuais daqueles do haplótipo (PARHAM, 2005).

Com o objetivo de determinar a influência haplótipos *KIR* do grupo A e B no paciente e no doador, assim como o genótipo *KIR*/HLA para avaliação de parâmetros do resultado tais como a sobrevivência,

relapso, mortalidade e GvHD, MCQUEEN e colaboradores (2007) avaliaram pacientes que realizaram transplantes HLA compatíveis. Análises de sobrevivência não revelaram nenhuma diferença significativa quando todos os pacientes foram comparados, embora fosse observada uma tendência menor da sobrevivência no par paciente AA e doador BB ou AB. Entretanto, quando somente pacientes com leucemia mielóide foram considerados, a mais alta taxa de sobrevivência foi observada entre pacientes BB ou AB e doadores AA, seguido por pacientes AA e doadores AA e pacientes BB ou AB e doadores BB ou AB (MCQUEEN et al., 2007). Transplantes que envolvem receptores AA e doadores BB ou AB tiveram menor taxa de sobrevivência, sendo 3,8 vezes mais provável ter mais baixa sobrevivência que transplantes em que o doador e o receptor eram AA ( $p=0.046$ ).

Estes resultados apontam que combinações de haplótipos *KIR* de doador e receptor influenciam no resultado de TCTH. Para leucemia mielóide, nota-se que doadores que possuem em seu genótipo o haplótipo B podem ser prejudiciais no resultado do transplante, e, pacientes com haplótipo B em seu genótipo pode ser benéfico (MCQUEEN et al., 2007).

Esta combinação de doador BB ou AB e do receptor AA é um fator de risco para o relapso e aGvHD depois do transplante para a leucemia mielóide. Oito de 59 transplantes executados para LMA/MDS envolveram esta combinação de genótipo *KIR* e quatro deles relapso. Dos 112 pacientes transplantados para a leucemia mielóide, a incidência de aGvHD em quatro combinações do genótipo *KIR* foram 46% (5/11) para o paciente AA/doador BB ou AB, 10% (2/20) para paciente e doador AA, 20% (2/10) doador AA/receptor BB ou AB e 30% (21/71) para doador e paciente BB ou AB (MCQUEEN et al., 2007). Os receptores AA com enxertos BB ou AB eram 5,8 vezes mais prováveis para o desenvolvimento clínico relevante da aGvHD (nível II-IV) do que os receptores AA com enxertos AA ( $p=0.04$ ).

Moléculas *HLA-C* são ligantes dominantes dos receptores *KIR*, sendo observado em diversas condições clínicas, incluindo aloreações benéficas das células *NK* após transplantes haploidênticos (RUGGERI et

al.,1999; RUGGERI et al., 2002). Investigações recentes indicam a influência do tipo *HLA-C* no resultado de transplantes.

A chave da diferença entre os ligantes C1 e C2 e seus receptores *KIR* é que o ligante C2 produz uma inibição mais forte que C1. Portanto, pacientes que faltam o grupo C2 são homozigotos (C1C1); já pacientes que têm o C2 podem ser heterozigotos (C1C2) ou homozigotos (C2C2).

Um fator de risco para a aGvHD (nível II-IV) foi encontrada para a combinação de doador BB ou AB e de receptor AA somente nos transplantes C1C1 e não em transplantes C2C2 ou C2C1 ( $p=0.004$ ). Quando o tipo de *HLA-C* foi examinado sem considerar o genótipo *KIR*, houve uma tendência para o homozigoto C1C1 como um fator de risco para GvHD ( $p=0.17$ ), não sendo o caso do homozigoto C2C2. A consideração de *HLA-C* em combinação com os genótipos *KIR* de doadores ou dos receptores igualmente suportou a correlação observada com todos os três fatores. Assim receptor-AA/C1C1 foi um fator de risco comparado ao receptor-AA/C2C2 ou C2C1, uma tendência similar foi considerada para doadores-BB ou AB/C1C1 (MCQUEEN et al., 2007). Além disso, em pacientes com leucemia mielóide uma tendência a menor taxa de sobrevivência total foi observada para a combinação do doador BB ou AB e receptor AA e C1C1 ( $p=0.08$ ).

A análise estendida de *HLA-B* revelou que Bw4 é um ligante muito mais forte para *KIR3DL1* do que a alternativa Bw6. A avaliação do tipo *HLA-B* do paciente e doador revelaram que aGvHD era mais predominante na presença de Bw4 do que em sua ausência. Assim a correlação para *HLA-B* é o oposto daquela considerada para *HLA-C*, em que o ligante inibidor mais forte está associado com a aGvHD. Quando pacientes com quatro combinações de genótipo *KIR* doador-receptor foram divididos de acordo com o tipo *HLA-B*, o aumento da aGvHD foi observado para a combinação de doador BB ou AB, de receptor BB ou AB e HLA-Bw4 positivo em comparação à mesma combinação quando Bw4 era ausente (quando o receptor era Bw6-Bw6 homozigoto). Nenhuma diferença na aGvHD foi observada quando Bw4 estava presente ou ausente em transplantes realizados com doador BB ou AB e

receptor AA, a combinação que mostrou aumentou da aGvHD foi quando o receptor era C1C1 (MCQUEEN et al., 2007).

Portanto, é observado um efeito claro do genótipo *HLA-C* influenciando o genótipo *KIR* no resultado do transplante. Na presença do C2, o inibidor mais forte, os efeitos prejudiciais da combinação do genótipo doador-BB ou AB e receptor AA são reduzidos. Estes dados são consistentes com um mecanismo em que as moléculas *HLA-C* do receptor podem inibir a reatividade derivada do doador, células que expressam receptores *KIR* contribuem para aGvHD e relapso, e o ligante C2 executa esta função melhor do que o ligante C1. A influência de *HLA-B* é mais fraca do que de *HLA-C* e na direção oposta. Portanto, o ligante mais forte Bw4 aumenta a probabilidade da aGvHD, indicando que *HLA-B* e *C* afetam o desenvolvimento da aGvHD através de diferentes mecanismos.

Uma vez que, a relação *KIR*-HLA classe I entre o doador e receptor tornar-se futuramente um componente de avaliação e seleção do doador, será necessário identificar diretamente a presença ou ausência de um gene *KIR* no doador. Portanto, um melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos nos efeitos observados deve ser avaliado. De resultados ainda controversos, esses estudos são sugestivos de que o transplante pode ter um melhor prognóstico quando se considera o perfil *KIR* do doador e os alelos HLA-Cw do receptor.

Tal modelo teórico, utilizando critérios de seleção da dupla doador/paciente baseados em interações *KIR*-ligante e comparações com tradicionais critérios de compatibilidade HLA poderão ser melhor explorados, caso esses pacientes atendidos pelo Serviço de Transplante do Erasto Gaertner, necessitem no futuro de um segundo alo-transplante e lhes reste como alternativa um doador haploidêntico e cujas características genéticas *KIR*-ligante sejam as ideais para que ocorra o efeito benéfico anti-leucemia. Adicionalmente, teremos já disponível e antecipado um protocolo com uma melhor caracterização dos pacientes do Hospital Erasto Gaertner caso se decida por incluir critérios *KIR*-Ligantes na seleção do doador/ receptor.



E, ainda que num grupo restrito de pacientes, nossas observações poderão somar aos demais estudos focados nas interações *KIR*-ligante que abrem novas perspectivas para pacientes que aguardam seu doador ideal.

## 8.CONCLUSÕES

- ✓ Quanto à composição do repertório *KIR* comparando-se pacientes e indivíduos controles normais pertencentes ao banco de dados do LIGH, os genes inibidores ***KIR2DL2* (p=0,0005)** e ***KIR2DL5* (p=0,0067)**, bem como os genes ativadores ***KIR2DS1* (p=0,0013)**, ***KIR2DS2* (p=0,0038)**, ***KIR2DS3* (p=0,0153)** apresentaram distribuições e frequências estatisticamente significativas (**p<0,05**).
- ✓ Da mesma quando as comparações do repertório *KIR* entre irmandades de pacientes e indivíduos controles normais observamos que os genes inibidores ***KIR2DL1* (p=0,0171)** e ***KIR2DL2* (p=0,0000)**, bem como os genes ativadores ***KIR2DS2* (p=0,0001)**, ***KIR2DS3* (p=0,0018)**, ***KIR2DS3* (p=0,0012)** apresentaram diferenças significativas (**p<0,05**).
- ✓ Também a comparação do repertório *KIR* entre pais de pacientes e indivíduos controles normais do banco de dados do LIGH, os genes inibidores ***KIR2DL2* (p=0,0078)** , bem como os genes ativadores ***KIR2DS2* (p=0,0466)**, ***KIR2DS3* (p=0,0274)**, apresentaram diferenças estatísticas também significativas (**p<0,05**).
- ✓ Na composição do repertório *KIR* de cada indivíduo o número total de locos *KIR* presentes variou entre um mínimo de 8 e um máximo de 15.
- ✓ No grupo paciente o número total de locos *KIR* presentes variou entre um mínimo de 1 e o máximo de 5 locos.
- ✓ No que se refere à distribuição e comparações de genótipos/haplótipos entre pacientes e controles, observamos que os homozigotos AA (**p=0,0463**) e heterozigotos AB (**p=0,0282**) apresentaram diferenças significativas.
- ✓ Dessa forma, nossos dados são sugestivos de que a composição do repertório e haplótipos *KIR*, bem como a distribuição de genes *KIR* ativadores e inibidores presentes no repertório *KIR* de

pacientes poderiam atuar como fatores predisponentes à doenças hematológicas com indicação de transplante .

- ✓ Estão previstas novas investigações com ampliação do tamanho amostral para que:
  - a) as observações do presente estudo possam ser corroboradas, interpretadas e fornecer evidências mais robustas sobre a influência do repertório *KIR* em genomas individuais no prognóstico das doenças hematológicas tais como a LMC;
  - b) melhor compreensão das interações *KIR*-ligantes na escolha do doador para que possa se beneficiar do efeito anti-leucêmico para o tratamento de doenças hematológicas descritas na literatura.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology** 5ed., Saunders, 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology** 4ed., Saunders, 2000.

ABI-RACHED, L.; PARHAM, P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. **J Exp Med** 8:1319–32; 2005.

AHLENSTIEL, G.; MARTIN, M. P.; GAO, X.; CARRINGTON, M.; REHERMANN, B. Distinct *KIR*/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. **J CLIN INVEST** 3:1017-26, 2008.

ALTER, G.; MARTIN, M.P.; TEIGEN, N.; CARR, W.H.; SUSCOVICH, T.J.; SCHNEIDEWIND, A.; et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. **J Exp Med** 204(12):3027–36; 2007.

ANFOSSI, N.; ANDRE, P.; GUIA, S.; FALK, C.S.; ROETYNCK, S.; STEWART, C.A.; et. al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. **Immunity** 25(2):331–42; 2006.

APLENC, R., ALONZO, T.A., GERBING, R.B., SMITH, F.O., MESHINCHI, S., ROSS, J.A., PERENTESIS, J., WOODS, W.G., LANGE, B.J., DAVIES, S.M.: **Ethnicity and survival in childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group.** *Blood*, **108**:74-80, 2006.

ARAMBURU, J.; BALBOA, M. A.; RAMIREZ, A.; SILVA, A.; ACEVEDO, A. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- $\gamma$  / $\delta$ +T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2 dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. **J. Immunol.** 144:3238–47; 1990.

ARASE, H.; MOCARSKI, E.S.; CAMPBELL, A.E.; HILL, A.B.; LANIER, L.L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. **Science** 296(5571):1323–6; 2002.

ARIFFIN, H., CHEN, S. P., KWOK, C. S., QUA, T.C., LIN, H. P., YEOH, A.E. Ethnic differences in the frequency of subtypes of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the Malaysia-Singapore Leukemia Study Group. **J. Pediatric Hematol Oncol.** 1: 27-31; 2007.

ASAI, O.; LONGO, D.L.; TIAN, Z.; et. al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. **J Clin Invest.** 101:1835-1842; 1998.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J. H. Activation of natural killer cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science** 85:727–30; 1999.

BEELEN, D.W.; OTTINGER, H.D.; FERENCIK, S.; *et al.* Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. **Blood** 105:2594–600; 2005.

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends in Genetics** 5: 289-290; 1989.

BESSON, C.; ROETYNCK, S.; WILLIAMS, F.; ORSI, L.; AMIEL, C.; LEPENDEVEN, C. *et al.* Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. **PLoS One** 5:e406; 2007.

BIASSONI R, PESSINO A, MALASPINA A, CANTONI C, BOTTINO C, SIVORI S, *et al.* Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. **Eur J Immunol** 27(12):3095–9; 1997.

BHATIA, S.: **Influence of race and socioeconomic status on outcome of children treated for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Curr Opin Pediatr* , 16:9-14, 2004.

BHATIA, S., SATHER, H.N., HEEREMA, N.A., TRIGG, M.E., GAYNON, P.S., ROBISON, L.L. **Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia.** *Blood*;100: 1957-1964; 2002.

BIRON, C.A.; BYRON, K. S. I.; SULLIVAN, J.L. Severe herpes virus infections in an adolescent without natural killer cells. **N Engl J Med**;320(26):1731–5, 1989.

BIRON, C.A.; NGUYEN, K.B.; PIEN, G.C.; COUSENS, L.P.; SALAZAR-MATHER, T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**. 17:189-220; 1999.

BISHARA, A.; DE SANTIS, D.; WITT, C.C.; BRAUTBAR, C.; CHRISTIANSEN, F.T.; OR, R.; NAGLER, A.; SLAVIN, S. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically

mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. **Tissue Antigens** .63:204; 2004.

BIX, M.; LIAO, N-S.; ZIJLSTRA, M.; LORING, J.; JAENISCH, R.; RAULET, D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. **Nature**, 349:329–31, 1991.

BORNHAUSER, M.; SCHWERDTFEGGER, R.; MARTIN, H.; FRANK, K.; THEUSER, C.; EHNINGER, G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors [letter]. **Blood**. 103:2860-2861; 2004.

BORNHAUSER, M.; THIEDE, C.; BRENDDEL, C.; et. al. Stable engraftment after megadose blood stem cell transplantation across the HLA barrier: the case for natural killer cells as graft-facilitating cells. **Transplantation**.68:87-88; 1999.

BONTADINI, A.; TESTI, M.; CUCCIA, M.C.; MARTINETTI, M.; CARCASSI, C.; CHIESA, A.; COSENTINI, E.; DAMETTO, E.; FRISON, S.; IANNONE, A.M.; LOMBARDO, C.; MALAGOLI, A.; MARIANI, M.; MARIOTTI, L.; MASCARETTI, L.; MELE, L.; MIOTTI, V.; NESCI, S.; OZZELLA, G.; PIANCATELLI, D.; ROMEO, G.; TAGLIAFERRI, C.; VATTA, S.; ANDREANI, M.; CONTE, R. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. **J Transl Med**. 27;4:44; 2006.

BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. **Nature** 405: 537-543; 2000.

BOYINGTON, J. C.; SUN, P. D. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. **Mol Immunol** 38:1007; 2002.

BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.; O'CALLAGHAN, C.A.; SODERSTROM, K.; D'ANDREA, A.; OGG, G.S.; LAZETIC, S.; YUNG, N.T.; BELL, J.L.; PHILIPS, J.H.; LANIER, L.L.; MCMICHAEL, A.J. HLA-E binds to natural Killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. **NATURE** 391: 795-799; 1998

BROUWER, R.E.; VAN DER HEIDEN, P.; SCHREUDER, G.M.; MULDER, A.; DATEMA, G.; ANHOLTS, J.D.; et. al. Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. **Hum Immunol** 63: 200–210; 2002.

BROWN, M. H.; BOLES, K.; ANTON VAN DER MERWE, P.; KUMAR, V.; MATHEW, P. A.; BARCLAY, N. A. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. **J. Exp. Med.** 188:2083–90; 1998.

BRUTKIEWICZ, R. R.; WELSH, R. M. Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. **J Virol** 69:3967– 71; 1995.

BUTSCH KOVACIC, M., et al. Variation of the killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C genes in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 14:2673–2677 2005.

CAO, T.M.; SHIZURU, J.A.; WONG, R.M.; et al. Engraftment and survival following reduced-intensity allogeneic peripheral blood hematopoietic cell transplantation is affected by CD8+ T-cell dose. **Blood** 105:2300–6; 2005.

CARR, W.H.; ROSEN, D.B.; ARASE, H.; NIXON, D.F.; MICHAELSSON, J.; LANIER, L.L. Cutting Edge:KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation.**J Immunol** 178(2):647–51; 2007.

CARR, W.H.; PANDO, M.J.; PARHAM, P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. **J Immunol** 175(8):5222–9; 2005.

CARRINGTON, M.; CULLEN, M. Justified chauvinism: advances in defining meiotic recombination through sperm typing. *Trends Genet* 20: 196-205; 2004.

CARRINGTON, M.; NORMAN, P. The KIR Gene Cluster. 2003.

CARRINGTON, M.; WANG, S.; MARTIN, M.P.; GAO, X.; SCHIFFMAN, M.; CHENG, J. et. al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **J Exp Med** 7:1069–75; 2005.

CELLA, M.; LONGO, A.; FERRARA, G.B.; STROMINGER, J.L.; COLONNA, M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. **J Exp Med** 180(4):1235–42; 1994.

CERWENKA, A.; BARON, J. L.; LANIER, L. L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. **Proc. Natl.Acad. Sci.** 98:11521–26; 2001.

CHAN, H.W.; MILLER, J.S.; MOORE, M.B.; LUTZ, C.T. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. **J Immunol** 175(9):5966–74; 2005.

CHIOREAN, E.G.; DYLLA, S.J.; OLSEN, K.; LENVIK, T.; SOIGNIER, Y.; MILLER, J.S. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). **Blood** 101:3527–3533; 2003.

CHEWNING, J.H.; GUDME, C.N.; HSU, K.C.; SELVAKUMAR, A.; DUPONT, B. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA–KIR ligand group in vitro. **J Immunol** 179(2):854–68; 2007.

CHEN, A.M.; GUO, X.M.; YAN, W.Y.; XIE, S.M.; ZHU, N.; WANG, X.D.; XU, R.; LIU, Q.P. Polymorphism of killer cell immunoglobulin-like receptor gene and its correlation with leukemia. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**. 1:35-8, 2007.

CLAUSEN, J.; WOLF, D.; PETZER, A.L.; GUNSILIUS, E.; SCHUMACHER, P.; KIRCHER, B.; GASTL, G.; NACHBAUR, D. Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell Transplantation. **Clinical and Experimental Immunology**, **148**: 520–528, 2007.

CLEGG, L.X., LI, F.P., HANKEY, B.F., CHU, K., EDWARDS, B.K. Cancer survival among US whites and minorities: a SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) Program population-based study. **Arch Intern Med**:162: 1985-1993; 2002.

COLONNA, M.; NAVARRO, F.; BELLON, T.; LLANO, M.; GARCIA, P. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **J. Exp. Med.** 186:1809–18; 1997.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science** 268:405-8; 1985.

COOK, M.A.; MOSS, P.A.; BRIGGS, D.C. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups. **Eur J Immunogenet** 30: 213-21; 2003.

COOK, M.A.; MILLIGAN, D.W.; FEGAN, C.D.; *et al.* The impact of donor



KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. **Blood** 103:1521–6; 2004.

COOKSEY, G.; ROBINS, R. A.; BLAMEY, R. W. Natural killer cells in renal allograft rejection. **Br J Surg** 71(11): 874; 1984.

COOLEY, S.; TRACHTENBERG, E.; BERGEMANN, T.L.; SAETEURN, K.; KLEIN, J.; LE, C.T.; MARSH, S.G.; GUETHLEIN, L.A.; PARHAM, P.; MILLER, J.S.; WEISDORF, D.J. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. **Blood** 3:726-32; 2009.

COSMAN, D.; FANGER, N.; BORGES, L.; KIBIN, M.; CHIN, W. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. **Immunity** 7:273–82; 1997.

CRUM, K.A.; LOGUE, S.E.; CURRAN, M.D.; MIDDLETON, D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. **Tissue Antigens** 56: 313–326; 2000.

DAVIES, G.E.; LOCKE, S.; WRIGHT, P.W.; LI, H.; HANSON, R.J.; MILLER, J.S.; et al. Identification of bidirectional promoters in the human KIR genes. **Genes Immun** 8(3):245–53; 2007.

DAVIES, S.M.; RUGGIERI, L.; DEFOR, T.; et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. **Blood**;100:3825–7; 2002.

DEMANET, C.; MULDER, A.; DENEYS, V.; WORSHAM, M.J.; MAES, P.; CLAAS, F.H.; et. al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? **Blood** 103: 3122–3130; 2004.

DENIS, L.; SIVULA, J.; GOURRAUD, P.A.; et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. **Tissue Antigens**. 66: 267-76, 2005.

DE SANTIS, D.; BISHARA, A.; WITT, C.S.; NAGLER, A.; BRAUTBAR, C.; SLAVIN, S.; CHRISTIANSEN, F.T. Natural killer cell HLA-C epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors both influence outcome of mismatched unrelated donor bone marrow transplants. **Tissue Antigens** 6:519; 2005.

DIEFENBACH, A.; JENSEN, E. R.; JAMIESON, A. M.; RAULET, D. H. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. **Nature** 413:165–71; 2001.

DIEFENBACH, A.; RAULET, D.H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. **Immunol Rev** 181:170–84; 2001.

DIEZ-CAMPELO, M.; PEREZ-SIMON, J.; OCIO, E.; *et al.* CD34+ cell dose and outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Leuk Lymph** 46:177–83; 2005.

DOKUN, A. O.; CHU, D. T.; YANG, L. *et al.* Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. **J Immunol** 167: 5286; 2001.

DOHRING, C.; SAMARIDIS, J.; COLONNA, M. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. **Immunogenetics** 44:227-30; 1996.

DOU, L.P.; ZHENG DE, H.; WANG, C.; LIU, J.H.; SUN, J.F.; JIN, H.J.; GAO, C.J.; YU, L.; DA, W.M. The diversity of KIR gene in Chinese Northern Han population and the impact of donor KIR and patient HLA genotypes on outcome following HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancy in Chinese people. **Int J Hematol**. 4:422-33; 2008.

DUPONT, B.; HSU, K.C. Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. **Curr Opin Immunol** 16:634–43; 2004.

ELKINS, W.L.; PICKARD, A.; PIERSON, G.R. Deficient expression of class-I HLA in some cases of acute leukemia. **Cancer Immunol Immunother** 18: 91–100; 1984.

ELMAAGACLI, A. H.; OTTINGER, H.; KOLDEHOFF, M.; PECENY, R.; STECKEL, N.K.; TRENSCHEL, R.; BIERACK, H.; GROSSE-WILDE, H.; BEELEN, D.W. Reduced risk for molecular disease in patients with chronic myeloid leukemia after transplantation from a KIR-mismatched donor. **Transplantation** 12:1741-7; 2005.

FAN, Q. R.; MOSYAK, L.; WINTER, C. C.; WAGTMANN, N.; LONG, E. O.; WILEY, D. C. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer resembles haematopoietic receptors. **Nature** 389:96; 1997.

FAN, Q.R.; LONG, E.O.; WILEY, D.C. Crystal structure of the human natural killer inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. **Nat Immunol** 2: 452-460; 2001.

FARAG, S.S.; BACIGALUPO, A.; EAPEN, M.; *et al.* The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. **Biol Blood Marrow Transplant** 12:876–84; 2006.

FARAG, S.S.; FEHNIGERR, T.A.; RUGGERI, L. Natural Killer cell receptors: a new biology and insights into the graft versus leukemia effect. **Blood** 100:1935-1947; 2002.

FERNANDEZ, N.C.; TREINER, E.; VANCE, R.E.; JAMIESON, A.M.; LEMIEUX, S.; RAULET, D.H. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. **Blood** 105(11):4416–23; 2005.

FOLEY B, DE SANTIS D, LATHBURY L, CHRISTIANSEN F, WITT C. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. **Int Immunol** 20(4):555–63; 2008.

FRASSATI, C.; TOUINSSI, M.; PICARD, C.; SEGURA, M.; GALICHER, V.; PAPA, K.; GAGNE, K.; VIVIER, E.; DEGIOANNI, A.; BÖETSCH, G.; MERCIER, P.; VÉLY, F.; DE MICCO, P.; REVIRON, D.; CHIARONI, J. Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in Comoros and Southeast France. **Tissue Antigens** 5: 356-67; 2006.

FRENCH, A. R.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and viral infections. **Curr Opin Immunol** 15:45– 51; 2003.

FROHN, C.; SCHLENKE, P.; KIRCHNER, H. The repertoire of HLA-Cw specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. **Immunology** 92:567–70; 1997.

FU, S.J.; YU, L.X.; LUO, M.; XIAO, L.L.; WANG, Y.B.; XU, J.; DU, C.F.; DENG, W.F. Analysis of natural killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Chinese. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1:109-13; 2009.

GAGNE, K.; BRIZARD, G.; GUEGLIO, B.; MILPIED, N.; HERRY, P.; BONNEVILLE, F.; CHENEAU, M.L.; SCHLEINITZ, N.; CESBRON, A.; FOLLEA, G.; HARROUSSEAU, J.L.; BIGNON, J.D. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. **Hum Immunol** 4:271; 2002.

GALLARDO, D.; CÁMARA, R.; NIETO, J.B.; ESPIGADO, I.; IRIONDO, A.; JIMÉNEZ-VELASCO, A.; VALLEJO, C.; MARTÍN, C.; CABALLERO, D.; BRUNET, S.; SERRANO, D.; SOLANO, C.; RIBERA, J.M.; RUBIA, J.; CARRERAS, E. Is mobilized peripheral blood comparable with bone

marrow as a source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation from HLA-identical sibling donors? A case-control study. **Haematologica** 94(9); 2009.

GAO, S.Q.; CHENG, L. H.; LU, L.; JIN, S. Z.; CHENG, X., ZOU, H. Y.; DENG, Z.H.; ZHU, W. G. Demographic characteristics of patients with leukemia waiting for stem cell transplantation in Chinese Marrow Donor Program during 2000 to 2006. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zi** 43(1): 19-23; 2009.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; PANDO, M.; CARR, W. H.; RAJALINGAM, R.; VILCHES, C.; PARHAM, P. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. **J Immunol** 166:2992; 2001.

GARNI-WAGNER, B. A.; PUROHIT, A.; MATHEW, P. A.; BENNETT, M.; KUMAR, K. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. **J. Immunol.** 151:60–70; 1993.

GAZIT, R.; GARTY, B.Z.; MONSELISE, Y.; HOFFER, V.; FINKELSTEIN, Y.; MARKEL, G.; et al. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. **Blood** 103(5):1965–6; 2004.

GENDZEKHADZE, K.; NORMAN, P.J.; ABI-RACHED, L.; LAYRISSE, Z.; PARHAM, P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. **Immunogenetics** 6:474-80; 2006.

GIEBEL, S.; LOCATELLI, F.; LAMPARELLI, T.; et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. **Blood** 102:814–19; 2003.

GOMEZ-LOZANO, N.; ESTEFANIA, E.; WILLIAMS, F.; HALFPENNY, I.; MIDDLETON, D.; SOLIS, R.; VILCHES, C. The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. **Eur J Immunol** 35:16-24; 2005.

GOMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, C.M.; PARHAM, P.; VILCHES, C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics** 54: 314-319; 2002.

GROVES, F.D.; LINET, M.S.; DEVESA, S.S. Patterns of occurrence of the leukaemias. **Eur J Cancer** 6:863-7; 1995.

- GUETHLEIN, L.A.; ABI-RACHED, L.; HAMMOND, J.A.; PARHAM, P. The expanded cattle KIR genes are orthologous to the conserved single-copy KIR3DX1 gene of primates. ***Immunogenetics*** 59(6):517–22; 2007.
- GUMPERZ, J.E.; BARBER, L.D.; VALIANTE, N.M.; PERCIVAL, L.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; et.al. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. ***J Immunol*** 158(11):5237–41; 1997.
- GUMPERZ, J.E.; VALIANTE, N.M.; PARHAM, P.; et al. Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. ***J Exp Med***; 183:1817–27; 1996.
- HANCOCK, W. W.; GEE, D.; De MOERLOOSE, P. et al. Immunohistological analysis of serial biopsies taken during human renal allograft rejection. ***Transplantation*** 39(4): 430; 1985.
- HAN, X., KILFOY, B., ZHENG, T., HOLFORD, T. R., ZHU, Y., ZHANG, Y. Lymphoma survival patterns by WHO subtype in the United States, 1973-2003. ***Cancer Causes Control*** 19:841–858; 2008.
- HANSASUTA, P.; DONG, T.; THANANCHAI. H.; WEEKES, M.; WILLBERG, C.; ALDEMIR, H.; et. al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. ***Eur J Immunol*** 34(6):1673–9; 2004.
- HAREL-BELLAN A., QUILLET A., MARCHIOL C., DeMARS R., TURSZ T., FRADELIZI D. Natural Killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. ***Proc Natl Acad Sci*** 83:5688; 1986.
- HASSAN, I.B., ISLAM, S.I., ALIZADEH, H., KRISTENSEN, J., KAMBAL, A., SONDAY, S., BERNSEEN, R.M. Acute leukemia among the adult population of United Arab Emirates: an epidemiological study. ***Leuk Lymphoma*** 50(7):1138-47; 2009.
- HAUCH, M.; GAZZOLA, M.V.; SMALL, T.; et. al. Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. ***Blood***. 7:2250-2262; 1990.
- HAWES, S.E., KIVIAT, N.B. Are genital infections and inflammation cofactors in the pathogenesis of invasive cervical cancer? ***J. Natl. Cancer Inst.*** 94:1592–1593; 2002.
- HEIMFELD, S. HLA-identical stem cell transplantation: is there an optimal CD34 cell dose? ***Bone Marrow Transplant*** 31:839–45; 2003.

- HIBY, S.E., WALKER, J.; O'SHAUGNESSY, K.; et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med* **200**:957–965; 2004.
- HITAMI, K.; TSUCHIYA, N.; YABE, T.; TOKUNAGA, K. Variations of human Killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes Human* 4: 160-167; 2003.
- HOLLOWIECKI, J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *POPOLSKIE ARCHIWUM MEDYCYNY WĘWNĘTRZNEJ*: 118 (11); 2008.
- HOLM, S.J., et al. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **125**:721–730; 2005
- HOUCHINS, J. P.; YABE, T.; MCSHERRY, C.; BACH, F. H. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 173:1017–20; 1991.
- HOU, L.; STEINER, N.K.; CHEN, M.; BELLE, I.; KUBIT, A.L.; NG, J. et al. Limited allelic diversity of stimulatory two-domain killer cell immunoglobulin-like receptors. *Hum Immunol* 3:174–8, 2008.
- HSU, K. C.; CHIDA, S.; DUPONT, B.; GERAGHTY, D. E. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunology Rev* 190:40; 2002A.
- HSU, K. C.; LIU, X. R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'RELLY, R. J.; DUPONT, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 169:5118; 2002B.
- HSU, K.C.; KEEVER-TAYLOR, C.A.; WILTON, A.; et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* **105**:4878–84; 2005.
- HSU, K.C.; GOOLEY, T.; MALKKI, M.; et al. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* **12**:828–36; 2006.
- HUGHES, A. L. Natural selection and diversification of vertebrate immune effectors. *Immunol Rev* 190:161; 2002.

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> Instituto Nacional do Câncer. Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2008 [online]. [2008] [acessado 05 Abr 2009]; URL:

<http://seer.cancer.gov/>. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program and the National Center for Health Statistics [online]. [2008] [acessado 05 Abr 2009].

INOUE H, YASUDA Y, HATTORI K, et al. The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34<sup>+</sup> stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 77:399-407; 2003.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Imunobiologia o sistema imunológico na saúde e na doença** 4ed., Artmed, 2000.

JENNES, W., et. al.. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among african female sex workers is associated with inhibitory *KIR* in the absence of their HLA ligands. *J. Immunol*. 177:6588–6592; 2006.

JIANG, Y.Z.; BARRETT, A.J.; GOLDMAN, J.M.; MAVROUDIS, D.A. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versusleukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 74:1–6; 1997.

JIANG, K.; ZHU, F.M.; LV, Q.F.; YAN, L.X.; Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens*. 65: 556-63; 2005.

JOHN, S. W. M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomicDNA from leukocyte. **Nucleic Acids Research**. 192:408, 1990.

KÄRRE, K. NK Cells, MHC Class I Molecules and Missing Self, **Scandinavian Journal of Immunology**. 55:221-228, 2002.

KÄRRE, K. Role of target hitocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation an hypotesis. In Callewaert D. Herberman RB, eds. Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells. San Diego: **Academic Press**. 81-91, 1985.

KARRE, K.; LJUNGGREN, H.G.; PIONTEK, G.; KIESSLING, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675–8; 1986.

KATZ, G.; MARKEL, G.; MIZRAHI, S.; ARNON, T.I.; MANDELBOIM, O. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor twodomain short tail number 4. **J Immunol** 166(12):7260–7; 2001.

KATZ, G.; GAZIT, R.; ARNON, T.I.; GONEN-GROSS, T.; TARCIC, G.; MARKEL, G., et al. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. **J Immunol** 173(3):1819–25; 2004.

KHAKOO, S. I.; CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunol. Rev.** 214, 186-201; 2006.

KHAKOO, S.I.; THIO, C.L.; MARTIN, M.P.; BROOKS, C.R.; GAO, X.; ASTEMBORSKI, J. et. al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **Science**. 305:872-4; 2004.

KHAKOO, S.I.; RAJALINGAM, R.; SHUM, B, P.; WEIDENBACH, K.; FLODIN, L.; MUIR, D.G.; CANAVEZ, F.; COOPER, S.L.; VALIANTE, N.M.; LANIER, L.L.; PARHAM, P. Rapid evolution of NK cell receptor system demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. **Immunity** 12: 687-698; 2000.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZEL, H. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cell. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol**, 5:122-207, 1975.

KIM, H.J.; CHOI, Y.; MIN, W.S.; KIM, T.G.; SHO, B.S.; KIM, S.Y.; EOM, K.S.; LEE, S.; MIN, C.K.; CHO, S.G.; KIM, D.W.; LEE, J.W.; KIM, C.C. The activating Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors as important determinants of Acute Graft-versus Host Disease in Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia. **Transplantation** 84: 1082-1091; 2007.

KIM, S.; POURSIANE-LAURENT, J.; TRUSCOTT, S.M.; LYBARGER, L.; SONG, Y.J.; YANG, L.; et. al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. **Nature** 436(7051):709–13; 2005.

KIM, S.; SUNWOO, J.B.; YANG, L.; CHOI, T.; SONG, Y.J.; FRENCH, A.R.; et. al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. **Proc Natl Acad Sci USA** 105(8):3053–8; 2008.

KOCA, E.; CHAMPLIN, R.E. Peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation: controversy remains. **Curr Opin Oncol** 20:220-6; 2008.



KUBIN, M. Z.; PARSHLEY, D. L.; DIN, W.; WAUGH, J. Y.; DAVIS-SMITH, T. Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. **Eur. J. Immunol.** 29:3466–77; 1999.

KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Seminars in Immunology* 20: 343-352; 2008.

KUMMEE, P.; TANGKIJVANICH, P.; POOVORAWAN, Y.; et al. Association of HLA-DRB1\*13 and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms with clearance of chronic hepatitis B infection and risk of hepatocellular carcinoma in Thai population. **J Viral Hepat.** 14:841-848; 2007.

KWIATKOWSKI, A. Trends in the incidence of leukaemia in Poland, 1963-90: an epidemiologic study. **Eur J Cancer Prev.** 3:277-83, 1994.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of the chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics** 40: 128; 1985.

LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annu Rev Immunol** 16:359–393; 1998.

LANIER, L. L. On guard-activating NK cell receptors. **Nat Immunol** 2:23; 2001.

LANIER, L. L.; CORLISS, B.; PHILLIPS, J. H. Arousal and inhibition of human NK cells. **Immunol. Rev.** 155:145–54, 1997.

LANIER, L.L. NK cell recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 23: 225-274; 2005.

LATCHMAN, Y.; MCKAY, P. F.; REISER, H. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. **J. Immunol.** 161:5809–12; 1998.

LEUNG, W.; IYENGAR, R.; TURNER, V.; LANG, P.; BADER, P.; CONN, P.; NIETHAMMER, D.; HANDGRETINGER, R. Determinants of antileukemia effects of allogeneic nk cells. *J Immunol.* 172: 644-650; 2004.

LIAO, N.S.; BIX, M.; ZIJLSTRA, M.; JAENISCH, R.; RAULET, D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. **Science** 253(5016):199–202; 1991.

- LIN, A.; XU, H.; YAN, W. Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. **Cell Mol Immunol** ;4(2):91–8; 2007.
- LIN, Y.; PROUD, G.; TAYLOR, R. M. R. et al. Renal allograft rejection: Protection of renal epithelium from natural killer cells by cytokine-induced up-regulation of class I major histocompatibility antigens. **Immunology** 79: 290; 1993.
- LJUNGGREN HG, KARRE K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol Today** 11(7):237–44; 1990.
- LONG, E.O.; BARBER, D.F.; BURSHTYN, D.N.; FAURE, M.; PETERSON, M.; RAJAGOPALAN, S.; RENARD, V.; SANDUSKY, M.; STEBBINS, C.C.; WAGTMANN, N.; WATZL, C. Inhibition of Natural Killer cell activation signals by Killer cell immunoglobulin-like receptors (CD58). **Immunol Rev** 181:223-33; 2001.
- LONG, E. O. Tumour cell recognition by natural killer cells. **Semin Cancer Biol** 12:57– 61; 2002.
- LOPEZ-VAZQUEZ, A.; RODRIGO, L.; MARTINEZ-BORRA, J.; PEREZ, R.; RODRIGUEZ, M.; FDEZ-MORERA, J.L. et. al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. **J Infect Dis** 1:162–5; 2005.
- LOTZOVA, E.; SAVARY, C. A.; HERBERMAN, R. B. Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. **Leuk Res** 11: 1059–1066; 1987.
- LUPSKI, J. R. Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms. **Mol Med** 4:3-11; 1998.
- LUQUE, I.; SOLANA, R.; GALIANI, M.D.; GONZALEZ, R.; GARCIA, F.; LOPEZ DE CASTRO, J.A.; et al. Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones. **Eur J Immunol** 26(8):1974–7; 1996.
- LUSZCZEK, W.; MANCZAK, M.; CISLO, M.; NOCKOWSKI, P.; WISNIEWSKI, A.; JASEK, M.; et. al. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. **Hum Immunol** 65(7):758–66; 2004.

MAIER, S.; TERTILT, C.; CHAMBRON, N. et al. Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28<sup>-/-</sup> mice. **Nat Med** 7: 557; 2001.

MAJORCZYK, E.; PAWLIK, A.; LUSZCZEK, W.; NOWAK, I.; WISNIEWSKI, A.; JASEK, M.; et al. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. **Genes Immun** 8:678–83, 2007.

MALNATI, M.S.; PERUZZI, M.; PARKER, K.C.; BIDDISON, W.E.; CICCONE, E.; MORETTA, A.; et al. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. **Science** 267(5200):1016–8; 1995.

MARTIN, M.P.; BASHIROVA, A.; TRAHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **J Immunol** 171:2192–2195; 2003.

MARTIN, M.P.; GAO, X.; LEE, J.H.; NELSON, G.W.; DETELS, R.; GOEDERT, J.J.; et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nat Genet** 31(4):429–34; 2002.

MARTIN, A.M.; FREITAS, E.M.; WITT C.S., CHRISTIANSEM, F. T. The genomic organization and evolution of the natural Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. **Immunogenetics** 51: 268–280; 2000.

MARTIN, A.M.; KULSKI, J.K.; GAUDIERI, S.; WITT, C.S.; FREITAS, E.M.; TROWSDALE, J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. **Gene** 335:121–31; 2004.

MCKALL, C.L.; HAKIM, F.T.; VELARDI, A. The lympho-hematopoietic system: effector and targeted of graft-versus-host disease. New York: Marcel Dekker; 2004.

MCKINNEY, P.A.; FELTBOWER, R.G.; PARSLow, R.C.; LEWIS, I.J.; PICTON, S.; KINSEY, S.E.; BAILEY, C.C. Survival from childhood cancer in Yorkshire, U.K.: effect of ethnicity and socio-economic status. **Eur J Cancer** 35:1816–1823, 1999.

MCQUEEN, K.L.; DORIGHI, K.M.; GUETHLEIN, L.A.; WONG, R.; SANJANWALA, B.; PARHAM, P. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. **Hum Immunol**. 5: 309–323; 2007.

MARBOE, C. C.; KNOWLES, D. M.; CHESS, L. et al. The immunologic and ultra-structural characterization of the cellular infiltrate in acute

cardiac allograft rejection: Prevalence of cells with the natural killer (NK) phenotype. **Clin Immunol Immunopathol** 27(1): 141; 1983.

MARSH, S. G. E.; PARHAM, P.; DUPONT, B.; GERAGHTY, D. E.; TROWSDALE, J.; MIDDLETON, D.; VILCHES, C.; CARRINGTON, M.; WITT, C.; GUETHLEIN, L. A.;

MARTIN, M. P.; BASHIROVA, A.; TRAHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **J Immunol** 171:2192-2195; 2003.

MARTIN, A.M.; FREITAS, E.M.; WITT, C.S.; CHRISTIANSEN, F.T. The genomic organization and evolution of Natural Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. **Immunogenetics** 51:268-80; 2000.

MARTIN, A.M.; KULSKI, J.K.; GAUDIERI, S.; WITT, C.S.; FREITAS, E.M.; TROWSDALE, J.; CHRISTIANSEN, F.T. Comparative genomic analysis and evolution of two *KIR* haplotypes A and B. **Gene**. 335: 121-31; 2004.

MARTIN, M. P. Tipagem de genes *KIR* e sua aplicação em estudos de populações, associação com doenças e transplantes. In: **CONGRESSO DA SBTMO**, 8., 2004, Curitiba.

MARTIN, M.P., et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **31**:429–434; 2002.

MARTIN, M.P.; NELSON, G.; LEE, J.H.; PELLETT, F.; GAO, X.; WADE, J.; et. al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol.* 169:2818-22; 2002.

MAXWEL, L. D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D.; CURRAN, M. D. A common *KIR2DS4* deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens** 60:254; 2002.

MENDEZ, A.; GRANDA, H.; MEENAGH, A.; CONTRERAS, S.; ZAVALITA, R.; MENDOZA, M.F.; et. al. Study of KIR genes in tuberculosis patients. **Tissue Antigens** 68(5):386–9; 2006.

MIDDLETON, D.; DILER, A.S.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; GOURRAU, P.A. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. **Tissue Antigens**. 6:553-60, 2009.

MIDDLETON, D.; MEENAGH, A.; GOURRAUD, P.A. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* 59:145-158; 2007.

MIDDLETON, D.; WILLIAMS, F.; HALFPENNY, I. A. KIR genes. **Transplant Immunology** 14 :135 – 142; 2005.

MIELCAREK , M.; GOOLEY, T.; MARTIN, P. J.; CHAUNCEY, T.R.; YUONG, B. A.; STORB, R.; TOROK-STORB, B. Effects of race on survival after stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplantation** 3: 231-9; 2005.

MILLER, J.S.; COOLEY, S.; PARHAN, P.; FARAG, S.S.; VERNERIS, M.R.; MCQUEEN, K.L.; GUETHLEIN, L.A.; TRACHTENBERG, E.A.; HAAGENSON, M.; HOROWITZ, M.M.; KLEIN, J.P.; WEISDORF, D.J. Missing KIR-ligand is associated with less relapse and increased graft versus host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood* 109, 5058-5061; 2007.

MINGARI, M. C.; VITALE, C.; CAMBIAGGI, A.; SCHIAVETTI, F.; MELIOLI, G.; FERRINI, S.; POGGI, A. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity. Expression of NK-related functional receptors for HLA-class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. **Int Immunol** 7:697-703; 1995.

MOESTA, A.K.; NORMAN, P.J.; YAWATA, M.; YAWATA, N.; GLEIMER, M.; PARHAM, P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C Than KIR2DL3. **J Immunol**;180(6):3969–79; 2008.

MOLICA, S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. **Leuk Lymphoma** 8:147-80; 2006.

MOMOT, T.; KOCH, S.; HUNZELMANN, N.; KRIEG, T.; ULBRICHT, K.; SCHMIDT, R.E.; et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 5:1561–5; 2004.

MOMOT, T., et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. **Arthritis Rheum.** 50:1561–156; 2004.

MORETTA A., TAMBUSI G., BOTTINO C. C., TRIPODI G., MERLI A., CICCONE E., PANTALEO G., MORETTA L., A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic. **J Exp Med** 171: 695; 1990.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Immunology** 16:626–633; 2004.

MORETTA, L.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; CANTONI, C.; PENDE, D.; MINGARI, M. C.; et al. Human NK cells and their receptors. **Microbes Infect** 4:1539– 44; 2002.

MORETTA, L.; ROMAGNANI, C.; PIETRA, G.; MORETTA, A.; MINGARI, M. C. NK-CTL, a novel HLA-E-restricted T cell subset. **Trends Immunol** 24:136-143; 2003.

MORICE, W.G.; KURTIN, P.J.; LEIBSON, P.J.; TEFFERI, A.; HANSON, C.A. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol** 6:1026–36; 2003.

NAKAJIMA, H.; CELLA, M.; LANGEN, H.; FRIEDLEIN, A.; COLONNA, M.; Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. **Eur. J. Immunol.** 29:1676–83; 1999.

NAMEKAWA, T.; SNYDER, M.R.; YEN, J.H.; GOEHRING, B.E.; LEIBSON, P.J.; WEYAND, C.M.; et. al. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. **J Immunol** 2:1138–45; 2000.

NAUMOVA, E.; MIHAYLOVA, A.; IVANOVA, M.; MIHAILOVA, S. Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma. **Cancer Immunol Immunother** 1:95–100; 2007.

[

NAUMOVA, E.; MIHAYLOVA, A.; STOITCHKOV, K.; IVANOVA, M.; QUIN, L.; TONEVA, M. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. **Cancer Immunol Immunother** 2:172–8; 2005.

NELSON, G.; MARTIN, M.; GLADMAN, D.; WADE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. **J Immunol.** 173:4273-4276; 2004.

NELSON, G.; MARTIN, M.; GLADMAN, D.; WADE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. **J Immunol.** 173:4273-4276; 2004.

NIOKOU, D.; SPYROPOULOU-VLACHOU, M.; DARLAMITSOU, A.; STAVROPOULOS-GIOKAS, C. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. **Hum Immunol** 64: 1167–1176; 2003.

NIKITINA-ZAKE, L.; RAJALINGHAM, R.; RUMBA, I.; SANJEEVI, C.B. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Latvian patients with type 1 diabetes mellitus and healthy controls. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1037:161–169; 2004.

NORMAN, P.J.; ABI-RACHED, L.; GENDZEKHADZE, K.; KORBEL, D.; GLEIMER, M.; ROWLEY, D.; BRUNO, D.; CARRINGTON, C.V.; CHANDANAYINGYONG, D.; CHANG, Y.H.; CRESPI, C.; SARUHANDIRESKENELI, G.; FRASER, P.A.; HAMEED, K.; KAMKAMIDZE, G.; KORAM, K.A.; LAYRISSE, Z.; MATAMOROS, N.; MILÀ, J.; PARK, M.H.; PITCHAPPAN, R.M.; RAMDATH, D.D.; SHIAU, M.Y.; STEPHENS, H.A.; STRUIK, S.; VERITY, D.H.; VAUGHAN, R.W.; TYAN, D.; DAVIS, R.W.; RILEY, E.M.; RONAGHI, M.; PARHAM, P. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. **Nat Genet** 9:1092-9; 2007.

NORMAN, P. G.; STEPHENS, H. A.; VERITY, D. H.; CHANDANAYINGYONG, D.; VAUGHAN, R. W. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. **Immunogenetics** 52:195; 2001.

NORMAN, P.J.; CARRINGTON, C.V.; BYNG, M.; et. al. Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) locus profiles in African and South Asian populations. **Genes Immun.** 3:86-95; 2002.

NORMAN, P.J., COOK, M.A.; CAREY, B.S.; CARRINGTON, C.V.; VERITY, D.H.; HAMEED, K., et.al. SNP haplotypes and allelic frequencies show evidence for disruptive and balancing selection in the human leukocyte receptor complex. **Immunogenetics.** 56:225-37; 2004.

NORMAN, P.J.; PARHAM, P. Complex interactions: the immunogenetics of human leukocyte antigen and Killer cell immunoglobulin-like receptors. **Semin Hematol.** 42:65-75; 2005.

NOWAKOWSKI, G.S.; MORICE, W.G.; PHYLIKY, R.L.; LI, C.Y.; TEFFERI, A. Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. **Br J Haematol** 4:490–2; 2005.

O'CONNOR, G.M.; GUINAN, K.J.; CUNNINGHAM, R.T.; MIDDLETON, D.; PARHAM, P.; GARDINER, C.M. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. **J Immunol** 178(1):235–41; 2007.

OLCESE, L.; CAMBIAGGI, A.; SEMENZATO, G.; BOTTINO, C.; MORETTA, A.; VIVIER, E. Human Killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. **J Immunol** 158:5083; 1997.

PANDO, M.G.; GARDINER, C.M.; CLEIMER, M.; MCQUEEN, K.L.; PARHAM, P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) is poorly expressed at cell surface due to substitution at positions 86 in Ig domains 0 and 182 in Ig domain 1. **J Immunol** 171:6640-9; 2003.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nat Rev Immunol** 3:201–14; 2005.

PARHAM, P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. **Immunol Lett** 1-2:11-3; 2004.

PARHAM, P. Immunogenetics of Killer-cell immunoglobulin-like receptors. **Tissue Antigens**. 62:194-200; 2003.

PARHAM, P.; MCQUEEN, K.L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nat Rev Immunol**. 3:108-122, 2003.

PASCAL, V.; YAMADA, E.; MARTIN, M.P.; ALTER, G.; ALTFELD, M.; METCALF, J.A.; et al. Detection of KIR3DS1 on the cell surface of peripheral blood NK cells facilitates identification of a novel null allele and assessment of KIR3DS1 expression during HIV-1 infection. **J Immunol** 179(3):1625–33; 2007.

PASSWEG, J.R.; STERN, M.; KOEHL, U.; et al. Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 35:637–43; 2005.

PEREZ-SIMON, J.A.; DIEZ-CAMPELO, M.; MARTINO, R.; et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Blood** 102:1108–13; 2003.

PERITT, D.; SESOK-PIZZINI, D. A.; SCHRETZENMAIR, R.; MACGREGOR, R. R.; VALIANTE, N. M. C1.7 antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7+CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease. **J. Immunol**. 162:7563–68 1999.

POPOOLA, J.; WOOD, K. J.; SACKS, S. H. et al. Infiltration of allografts by natural killer cells precedes T cells: Cross talk between the innate and adaptive immune system? **Am J Transplant** 1(S): 168; 2001.



PRITCHARD-JONES K., KAATSCH P., STELIAROVA-FOUCHER E., STILLER C.A., COEBERGH J.W.: **Cancer in children and adolescents in Europe: developments over 20 years and future challenges.** *Eur J Cancer*, **42**:2183-2190, 2006.

PUI, C.H., BOYETT, J.M., HANCOCK, M.L., PRATT, C.B., MEYER, W.H., CRIST, W.M. Outcome of treatment for childhood cancer in black as compared with white children. The St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 through 1992. *JAMA* 273:633-637, 1995.

QI, Y.; MARTIN, M.P.; GAO, X.; JACOBSON, L.; GOEDERT, J.J.; BUCHBINDER, S.; et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2(8):e79; 2006.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E.O. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med* 185(8):1523-8; 1997.

RAJALINGAM, R.; KRAUSA, P.; SHILLING, H.G.; STEIN, J.B.; BALAMURUGAN, A.; MCGINNIS, M.D. et. al. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics* 53: 1009-1019; 2002.

RAULET, D.H.; HELD, W.; CORREA, I.; DORFMAN, J.R.; WUM, F.; CORRAL, L. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev* 155:41-52; 1997.

REISNER, Y.; MARTELLI, M.F. Transplantation tolerance induced by 'mega dose' CD34+ cell transplants. *Exp Hematol* 28:119-27; 2000.

ROCHA, V.; LABOPIN, M.; GLUCKMAN, E. et al. Relevance of bone marrow cell dose on allogeneic transplantation outcomes for patients with acute myeloid leukemia in first complete remission: results of a European survey. *J Clin Oncol* 20:4324-30; 2002.

ROMERO, V.; AZOCAR, J.; ZUNIGA, J.; CLAVIJO, O.P.; TERREROS, D.; GU, X. et. al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 9:2429-36; 2008.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; CASUCCI, M.; VOLPI, I.; TOSTI, A.; PERRUCCIO, K.; URBANI, E.; NEGRIN, R. S.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Role of *natural killer* cells alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94: 333-339; 1999.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; MANCUSI, A.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Natural killer cells as a therapeutic tool in mismatched transplantation. **Best Practice & Research Clinical Haematology** 17: 427-438; 2004B.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; URBANI, E.; PERRUCCIO, K.; SHLOMCHIK, W.D.; TOSTI, A.; et. al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *J Clin Invest* 101:1835–1842; 1998.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; URBANI, E.; PERRUCCIO, K.; SHLOMCHIK, W.D.; TOSTI, A.; POSATI, S.; ROGAIA, D.; FRASSONI, F.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. **Science** 95:2097-2100; 2002.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; MANCUSI, A.; URBANI, E.; PERRUCCIO, K.; BURCHIELLI, E.; TOSTI, A.; TOPINI, F.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Alloreactive natural killer cells in mismatched hematopoietic stem cell transplantation. **Blood Cells, Molecules, and Diseases** 33: 216-221; 2004A.

RUGGERI, L.; MANCUSI, A.; BURCHIELLI, E.; PERRUCCIO, K.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation. *Semin Cancer Biol* 5:404-11; 2006.

RUGGERI, L.; MANCUSI, A.; CAPANNI, M.; URBANI, E.; CAROTTI, A.; ALOISI, T.; STERN, M.; PENDE, D.; PERRUCCIO, K.; BURCHIELLI, E.; TOPINI, F.; BIANCHI, E.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. **Blood** 1:433-40; 2007.

SAMBROOK, J.G.; BASHIROVA, A.; ANDERSEN, H.; PIATAK, M.; VERNIKOS, G.S.; COGGILL, P.; et al. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. **BMC Genomics** 7:209; 2006.

SANTAOURLIDIS, S.; TROMPETER, H.-I.; WEINHOLD, S.; EISERMANN, B.; MEYER, K. L.; WERNET, P.; UHRBERG, M. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. **J Immunol** 169:4253-4261; 2002.

SCHELLEKENS, J.; ROZEMULLER, E. H.; PETERSEN, E. J.; VAN DEN TWEEL, J. G.; VERDONCK, L.F.; TILANUS, M.G. Activating KIRs exert

a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. **Mol Immunol.** 8:2255-6; 2008.

SCHMITZ, N.; BEKSAC, M.; HASENCLEVER, D.; *et al.* Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. **Blood** 100:761–7; 2002.

SCQUIZZATO, E.; TERAMO, A.; MIORIN, M.; FACCO, M.; PIAZZA, F.; NOVENTA, F.; TRENTIN, L.; AGOSTINI, C.; ZAMBELLO, R.; SEMENZATO, G. Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. **Leukemia.** 5:1060-9; 2007.

SCOTT, J. L.; DUNN, S. M.; HILLAM, A. J.; WALTON, S.; BERNDT, M. C. Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. **J. Biol. Chem.** 264:13475–82; 1989.

SCONOCCHIA, G.; LAU, M.; PROVENZANO, M.; REZVANI, K.; WONGSENA, W.; FUJIWARA, H.; HENSEL, N.; MELENHORST, J.; LI, J.; FERRONE, S.; BARRETT, A.J. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. **Blood** 10:3666-72; 2005.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. **Tissue Antigens** 48:285-94; 1996.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. **Immunol Rev** 155:183; 1997A.

SHIBUYA, A.; CAMPBELL, D.; HANNUM, C.; YSSEL, H.; FRANZ-BACON, K. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. **Immunity** 4:573–81; 1996.

SHILLING, H.; GARCIA, C. A.; HSU, K. C.; WAIN, H. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002. **Tissue Antigens** 62:79-86; 2003.

SHILLING, H.G.; MCQUEEN, K.L.; CHENG, N.W.; SHIZURU, J.A.; NEGRIN, R.S.; PARHAM, P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. **Blood** 101(9):3730; 2003.

SHILLING, H. G.; GUETHLEIN, L. A.; CHENG, N. W.; GARDINER, C. m.; RODRIGUEZ, R.; TYAN, D.; PARHAM, P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. **J Immunol** 168:2307; 2002.

SHILLING, H. G.; GUETHLEIN, L. A.; CHENG, N. W.; GARDINER, C. m.; RODRIGUEZ, R.; TYAN, D.; PARHAM, P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. **J Immunol** 168:2307; 2002.

SHILLING, H.G.; YOUNG, N.; GUETHLEIN, L.A.; CHENG, N.W.; GARDINER, C.M.; TYAN,D.; PARHAM, P. Genetic control of human NK cell repertoire. **J Immunol** 169:239-247; 2002.

SHIMIZU, Y.; DeMARS, R. Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. **European Journal of Immunology** 19:447; 1989.

SHLOMCHIK, W.D., COUZENS, M.S., TANG, C.B., et.al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. **Science** 285:412-415; 1999.

SHUM, B. P.; FLODIN, L. R.; MUIR, D. G.; RAJALINGAM, R.; KHAKOO, S. I. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. **J. Immunol.** 168:240–52; 2002.

SINGHAL, S.; POWLES, R.; TRELEAVEN, J.; *et al.* A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2 x 10(6) CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? **Bone Marrow Transplant** 26:489–96; 2000.

SINGLE, R.M.; MARTIN, M.P.; GAO, X.; MEYER, D.; YEAGER, M.; KIDD, J.R. et al. Global diversity and evidence for coevolution of *KIR* and HLA. **Nat Genet** 9:1114–9, 2007.

SIVORI, S.; PAROLINI, S.; FALCO, M.; MARCENARO, E.; BIASSONI, R. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. **Eur. J. Immunol.** 30:787–93; 2000.

SMALL, T.N.; AVIGAN, D.; DUPONT, B.; et. al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. **Biol Blood Marrow Transplant.** 3:65-67; 1997.

SMALL, T.N.; PAPADOPOULOS, E.B.; BOULAD, F.; et. al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. **Blood**. 93:467-480; 1999.

SPALLEK, J.; SPIX, C.; ZEEB, H.; KAATSCH, P.; RAZUM, O. Cancer patterns among children of Turkish descent in Germany: a study at the German Childhood Cancer Registry. **BMC Public Health**, 8:152, 2008.

SPIELMAN, R.S.; MCGINNIS, R. E.; EWENS, W.J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). **Am J Hum Genet** 52: 506-516.

SPEISER, D. E.; COLONNA, M.; AYYOUB, M.; CELLA, M.; PITTET, M. J.; The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector  $\alpha\beta$  T cells. **J. Immunol.** 167:6165–70; 2001.

SPITS, H.; BLOM, B.; JALECO, A. C.; WEIJER, K.; VERSCHUREN, M. C. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. **Immunol. Rev.** 165:75–86, 1998.

STEM CELL TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data metaanalysis of nine randomized trials. **J Clin Oncol** 23:5074-87; 2005.

STILLER, C.A.; BUNCH, K.J.; LEWIS, I.J. Ethnic group and survival from childhood cancer: report from the UK Children Cancer Study Group. **British Journal of Cancer** 7: 1339–1343; 2000.

STEWART, C.A.; VIVIER, E.; COLONNA, M. Strategies of natural killer cell recognition and signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:1-21; 2005.

SUN, J.Y.; GAIDULIS, L.; DAGIS, A.; PALMER, J.; RODRIGUEZ, R.; MILLER, M.M.; FORMAN, S.J.; SENITZER, D. Killer Ig like receptor (KIR) compatibility plays a role in the prevalence of acute GVHD in unrelated hematopoietic cell transplants for AML. **Bone Marrow Transplant** ;36(6):525; 2005.

SUZUKI, Y.; HAMAMOTO, Y.; OGASAWARA, Y.; ISHIKAWA, K.; YOSHIKAWA, Y.; SASAZUKI, T.; et. al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. **J Invest Dermatol** 122(5):1133–6; 2004.

TAJIK, N.; SHAHSAVAR, F.; MOUSAVI, T.; RADJABZADEH, M.F. Distribution of KIR genes in the Iranian population. **Tissue Antigens**. 1:22-31; 2009 .

TANAKA, J.; TUTUMI, Y.; MORI, A.; et. al. Sequential analysis of HLA-C specific killer cell inhibitory receptor (CD158b) expressing peripheral blood mononuclear cells during chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**. 26:287-290; 2000.

TANAKA, J.; MORI, A.; OHTA, S.; et. al. Expression of HLA-C-specific natural killer cell receptors (CD158a and CD158b) on peripheral blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation. **Br J Haematol**. 108:778-783; 2000.

THANANCHAI, H.; GILLESPIE, G.; MARTIN, M.P.; BASHIROVA, A.; YAWATA, N.; YAWATA, M.; et.al. Cutting edge: allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. **J Immunol** 178(1):33–7; 2007.

TOYAMA-SORIMACHI, N.; TAGUCHI, Y.; YAGITA, H.; KITAMURA, F.; KAWASAKI, A. Mouse CD94 participates in Qa-1- mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49. **J. Immunol**. 166:3771–79; 2001.

TONEVA, M.; LEPAGE, V.; LAFAY, G.; DULPHY, N.; BUSSON, M.; LESTER, S.; VU-TRIEN, A.; MICHAYLOVA, A.; NAUMOVA, E.; McCLUSKEY, J. et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens** 57:358-362; 2001.

TORKAR, M.; NORGATE, Z.; COLONNA, M.; TROWSDALE, J.; WILSON, M. J. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. **Eur J Immunol** 28:3959-67; 1998.

TOTTERMAN, T. H.; HANAS, E.; BERGSTROM, R. et al. Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft-infiltrating functional and activated T and NK cell subsets. **Transplantation** 47(5): 817; 1989.

TRINCHERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol** 47: 187; 1989.

TROWSDALE, J.; BARLEN, R.; HAUDE, A.; STEWART, C. A.; BECK, S.; WILSON, M. J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. **Immunol Rev** 181:20; 2001.

TROWSDALE, J. Genetic and function relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity** 15: 363-374; 2001.

TRUNDLEY, A.; FREBEL, H.; JONES, D.; CHANG, C.; TROWSDALE, J. Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. **Eur J Immunol**;37(3):780–7; 2007.

UHRBERG, M.; PARHAM, P.; WERNET, P. Definition of content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics** 54:221-9; 2002.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N. M.; SHUM, B. P.; SHILLING H. G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYLAN, D.; LANIER, L. L.; PARHAM, P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity** 7:753; 1997.

VALES-GOMEZ, M.; REYBURN, H. T.; ERSKINE, R. A.; STROMINGER, J. Differential binding to HLA-C of p50-inhibitory natural killer cell receptors. **Proc Natl Acad Sci** 95:14326; 1998.

VALIANTE, N. M.; UHRBERG, M.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; ARNETT, K. L.; D'ANDREA, A.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L.; PARHAM, P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity** 7:739; 1997.

VALIANTE, N.M.; TRINCHIERI, G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes **J. Exp. Med.** 178:1397–406; 1993.

VAMPA, M. L.; NORMAN, P. J.; BURNAPP, L.; VAUGHAN, R. W.; SACKS, S. H.; WONG, W. Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. **Transplantation** Vol. 76, 1220–1228, No. 8, October 27, 2003.

VAN DER SLIK, A.R.; KOELEMAN, B.P.; VERDUIJN, W.; BRUINING, G.J.; ROEP, B.O.; GIPHART, M.J. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. **Diabetes**. 52:2639-42; 2003.

VAN DER MEER, A.; SCHAAP, N. P. P.; SCHATTENBERG, A. V. M. B.; CRANENBROEK, B. V.; TIJSSEN, H. J.; JOOSTEN, I. KIR2DS5 is associated with leukemia free survival after HLA identical stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia patients. **Molecular Immunology** 45: 3631-3638; 2008.

VELARDI, A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol* 5: 581-7; 2008

VELARDI, A.; RUGGERI, L.; MANCUSI, A.; AVERSA, F.; CHRISTIANSEN, F.T. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* (Epub ahead of print), 2009.

VELARDI, A.; RUGGERI, L.; MORETA, A.; MORETA, L. NK-cells: a lesson from mismatched haematopoietic transplantation. *Trends in Immunology* 23:438-444; 2002.

VELARDI, A.; RUGGERI, L.; CAPANNI M., et.al. Impacto of NK cell alloreactivity on mismatched haematopoietic transplantation: an update on donor selection criteria and on transplantation outcomes. *Blood* 102:153a; 2003.

VELICKOVIC, M.; VELICKOVIC, Z.; DUNCKLEY, H. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Pacific Islands populations. *Immunogenetics* 7:523-32; 2006.

VERHEYDEN, S.; BERNIER, M.; DEMANET, C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia*. 12:2002-7; 2004.

VERHEYDEN, S.; SCHOTS, R.; DUQUET, W.; DEMANET, C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 19(8):1446; 2005.

VILCHES, C.; PANDO, M. J.; RAJALINGAM, R.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P. Discovery of two novel variants of KIR2DS5 reveals this gene to be a common component of human KIR 'B' haplotypes. *Tissue Antigens* 56:453-6; 2000B.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20:217–251; 2002.

VILCHES, C.; RAJALINGAM, R.; UHRBERG, M.; GARDINER, C. M.; YOUNG, N. T.; PARHAM, P. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *J Immunol* 164:5797-804; 2000C.

VIVIER, E.; ANFOSSI, N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 4:190-198; 2004.



VOLLMER, M.; LI, L.; SCHMITT, A.; GREINER, J.; REINHARDT, P.; RINGHOFFER, M.; et al. Expression of human leucocyte antigens and co-stimulatory molecules on blasts of patients with acute myeloid leukaemia. **Br J Haemato**; 120: 1000–1008, 2003.

ZAPPACOSTA, F.; BORREGO, F.; BROOKS, A.G.; PARKER, K.C.; COLIGAN, J.E. Peptides isolated from HLA-Cw\*0304 confer different degrees of protection from natural killer cell-mediated lysis. **Proc Natl Acad Sci USA** 94(12):6313–8; 1997.

ZAUCHA, J.M.; GOOLEY, T.; BENSINGER, W.I.; et al. CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. **Blood** 98:3221–7; 2001.

ZEIS, M.; UHAREK, L.; GLASS, B.; et al. Allogeneic NK cells as potent anti-leukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice. **Transplantation**. 20:217-251;1995.

ZHAO, X.Y.; CHANG, Y.J.; HUANG, X.J. Differential expression levels of killer immunoglobulin-like receptor genotype in patients with hematological malignancies between high-risk and standard-risk groups. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi** 4:746-9; 2008.

ZHANG, L.; HSU, K.; LIU, X.; DUPONT, B.; FAN, L. KIR gene content diversity and haplotype analysis in Chinese Han in Shanghai area. *Hum Immunol*. 64(suppl):S167; 2003.

ZHI-MING, L.; YU-LIAN, J.; ZHAO-LEI, F.; CHUN-XIAO, W.; ZHEN-FANG, D.; BING-CHANG, Z.; YUE-RAN, Z. Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. **Croat Med** 6:800-6; 2007.

WAGTMANN, N.; BIASSONI, R.; CANTONI, C.; VERDIANI, S.; MALNATI, M. S.; VITALE, M.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; LONG, E. O. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. **Immunity** 2:439-49; 1995.

WALL, J.D., PRITCHARD, J.K. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. **Nat Rev Genet** 4:587-597

WHANG, D.H.; PARK, H.; YOON, J.A., PARK, M.H. Haplotype analysis of Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Hum Immunol* 66:146-54; 2005.

WILLIAMS, F. MAXWELL, L.D.; HALFPENNY, I.A.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; CURRAN, M.D.; MIDDLETON, D. Multiple copies of KIR3DL/S1 and KIR2DL4 genes identified in a number of individual. ***Hum Immunol*** 64:729-732; 2005.

WILSON, M. J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S.; TROWSDALE, J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. ***Proc Natl Acad Sci*** 97:4778; 2000.

WILSON, M. J.; TORKAR, M.; TROWSDALE, J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. ***Tissue antigens*** 49:574; 1997.

WINTER, C.C.; GUMPERZ, J.E.; PARHAM, P.; LONG, E.O.; E WAGTMANN, N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. ***J. Immunol.*** 161:571–577, 1998.

WINTER, C.C.; LONG, E.O. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. ***J Immunol*** 158(9):4026–8; 1997.

WITT, C. S.; DEWING, C.; SAYER, D. C.; UHRBERG, M.; PARHAM, P.; CHRISTIANSEN, F. T. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. ***Transplantation*** 68:1784; 1999.

WITT, C. S.; MARTIN, A.; CHRISTIANSEN, F. T. Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmatic tail. ***Tissue Antigens*** 56:248; 2000.

WITT, C. S.; CHRISTIANSEN, F. T. The relevance of nature Killer cell human leucocyte antigen epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors in bone marrow transplantation. ***Vox Sanguinis*** 90, 10-20; 2006.

YAMAMOTO, J. F.; GOODMAN, M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. ***Cancer Causes Control*** 19:379–390; 2008.

YAMASAKI, S.; HENZAN, H.; OHNO, Y.; *et al.* Influence of transplanted dose of CD56+ cells on development of graft-versus-host disease in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA-identical sibling donors. ***Bone Marrow Transplant*** 32:505–10; 2003.

YAN, W.H.; LIN, A.; CHEN, B.G.; ZHOU, M.Y.; DAI, M.Z.; CHEN, X.J.; et. al. Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy. **AmJ Reprod Immunol** 57(4):233–42; 2007.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; DRAGHI, M.; LITTLE, A.M.; PARTHENIOU, F.; PARHAM, P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. **J Exp Med** 203(3):633–45, 2006.

YAWATA, M.; YAWATA N.; McQUEEN, K. L.; CHENG, N. W.; GUETHLEIN, L. A.; RAJALINGAM, R.; SHILLING, H. G.; PARHAM, P. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. **Immunogenetics** 54:543; 2002

YEN, J.H.; LIN, C.H.; TSAI, W.C.; WU, C.C.; OU, T.T.; HU, C.J.; et. al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**. 35:124-7; 2006.

YEN ,J.H.; MOORE, B.E.; NAKAJIMA, T., SCHOLL, D.; SCHAID, D.J.; WEYAND ,C.M.; et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **J Exp Med**. ;193:1159-67; 2001.

YU, Y.Y.L.; KUMAR, V.; BENNET, M. Murine natural killer cells and marrow graft rejection. **Annu Rev Immunol** 10:189-213; 2001.

YU, J.; VENSTROM, J.M.; LIU, X.R.; PRING, J.; HASAN, R.S.; O'REILLY, R,J.; HSU, K.C. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell–depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**.113(16):3875-84; 2009.



## ANEXO I

TABELA DE SINÔNIMOS DOS LOCOS *KIR*

TABELA 1

Símbolo do gene	Símbolo da proteína	Descrição	Sinônimos
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 1	47.11, CD158a, cl-42, nkat1, p58.1
<i>KIR2DL2</i>	KIR2DL2	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 2	CD158b1, cl-43, nkat6
<i>KIR2DL3</i>	KIR2DL3	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 3	CD158b2, cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58
<i>KIR2DL4</i>	KIR2DL4	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 4	15.212, 103AS, CD158d
<i>KIR2DL5A</i>	KIR2DL5A	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 5A	CD158f, KIR2DL5.1
<i>KIR2DL5B</i>	KIR2DL5B	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4
<i>KIR2DS1</i>	KIR2DS1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 1	CD158h, EB6ActI, EB6ActII
<i>KIR2DS2</i>	KIR2DS2	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 2	183ActI, CD158j, cl-49, nkat5
<i>KIR2DS3</i>	KIR2DS3	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 3	nkat7
<i>KIR2DS4</i>	KIR2DS4	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 4	CD158i, cl-39, KKA3, nkat8
<i>KIR2DS5</i>	KIR2DS5	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 5	CD158g, nkat9
<i>KIR2DP1</i>	KIR2DP1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, pseudogene 1	KIR2DL6, KIR15, KIRY, KIRZ
<i>KIR3DL1</i>	KIR3DL1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática longa, 1	AMB11, CD158e1, cl-2, cl-11, KIR, nkat3, NKB1, NKB1B

<i>KIR3DL2</i>	KIR3DL2	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática longa, 2	CD158k, cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b
<i>KIR3DL3</i>	KIR3DL3	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática longa, 3	CD158z, KIR3DL7, KIR44, KIRC1
<i>KIR3DS1</i>	KIR3DS1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática curta, 1	CD158e2, nkat10
<i>KIR3DP1</i>	KIR3DP1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, pseudogene 1	CD158c, KIR2DS6, KIR3DS2P, KIR48, KIRX

**ANEXO II**  
**PROTOCOLOS DE TÉCNICAS**  
**PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA – MÉTODO SALTING OUT**

1. Identificar tubos de 1,5mL tipo Eppendorf
2. Transferir 500 $\mu$ L de buffy-coat para cada tubo
3. Acrescentar 800 $\mu$ L de tampão de lise de células vermelhas (**RCLB 1X**)
4. Passar rapidamente no Vórtex
5. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão de células em 1mL de **RCLB 1X**, passar no Vórtex, centrifugar 13000 rpm por 2 minutos e desprezar o sobrenadante
7. **Repetir o passo 6** até que se obtenha um precipitado claro
8. Desprezar o último sobrenadante e adicionar: 80 $\mu$ L de **tampão da Proteinase K**, 40 $\mu$ L da **Proteinase K**, 20 $\mu$ L de **SDS a 20%** e 240 $\mu$ L de **água Milli-Q**. Homogeneizar em Vórtex
9. Incubar em banho-maria a 55 °C por 40 minutos. Agitar aos 20 minutos
10. Deixar atingir temperatura ambiente antes de prosseguir
11. Adicionar 100 $\mu$ L de solução saturada de **NaCl (6M)**. Agitar no vórtex
12. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
13. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5mL com 100 $\mu$ L de **NaCl (6M)** e centrifugar novamente a 13000 rpm por 5 minutos
14. Transferir o sobrenadante para novo tubo de 1,5mL e acrescentar 800 $\mu$ L de **ETOH absoluto gelado** e inverter gentilmente várias vezes para precipitar o DNA
15. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
16. Desprezar o sobrenadante e adicionar 1mL de **etanol 70%**
17. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
18. Desprezar o sobrenadante e deixar secar a temperatura ambiente
19. Ressuspender o DNA em 50 $\mu$ L de **água Milli-Q**
20. Deixar em geladeira por pelo menos um dia para reidratar o DNA
21. Deixar em banho-maria por 30 minutos para dissolver bem
22. Homogeneizar
23. Proceder a leitura da Densidade Ótica ou armazenar a -20°C

Obs.: Antes dos procedimentos, deve-se efetuar a limpeza das bancadas com Álcool 70%. Após o término, nova limpeza com Hipoclorito 1% e Álcool 70%.

### **PROTOCOLO DE HIBRIDIZAÇÃO (PCR-SSOP)**

1. Identificar uma placa de PCR nova para os 3 grupos de primers (G1, G2 e G3);
2. Pegar recipientes para Tampão de Lavagem, Tampão de Neutralização e Tampão de Desnaturação;
3. Pegar borracha para tampar a placa de PCR (na gaveta dentro de uma caixa);
4. Ligar termociclador no programa SSO 60°C;
5. Transferir 2,5µL de cada Dna amplificado para a nova placa de PCR (usando a pipeta multicanal da Eppendorf (possui ponteiros específicas));
6. Fechar placa com a borracha;
7. Pôr o Tampão de Desnaturação no seu recipiente (fica numa caixa sobre a bancada);
8. 1,25µL de Tampão de desnaturação em cada poço da placa (colocar gota na parede do poço – usar uma ponteira para todas as amostras);
9. Bater fraco na bancada para descer o reagente;
10. Tampar;
11. Agitar no vortex, dar um spin na centrífuga até 2000rpm (a coloração ficará mais rosa);
12. Incubar na bancada à temperatura ambiente por 10 MIN;
13. Devolver Tampão;
14. \* Durante esse tempo de espera prepara-se as Beads;
15. Separar e identificar 3 tubos eppendorf, um para cada grupo de Beads (G1, G2 e G3);
16. Pegar papel alumínio para cobrir os eppendorfs com as Beads (na gaveta junto ao suporte);
17. 544µL do Tampão de Hibridização em cada um dos 3 eppendorfs (volume para 32 amostras);
18. Homogeneizar bem as Beads (aproximadamente 1 MIN cada, devido sua tendência de aglomerar (ficam na geladeira));
19. Dar uma flicada de leve para descer;
20. 64µL de cada Bead (cuidar a identificação das Beads (usar ponteiros com filtro));
21. Homogeneizar com a ponteira;
22. Deixar o mix de Beads em local escuro (na gaveta);
23. Guardar Tampão e Beads;
24. \*\* Dado o tempo de incubação, colocar o Tampão de Neutralização no recipiente;
25. Pegar isopor com gelo na terceira porta do freezer -80°;
26. 2,5µL de Tampão de Neutralização em cada poço (pôr gota na parede);
27. Bater de leve na bancada;
28. Fechar placa com a borracha e agitar no vortex com cuidado para não formar bolhas (verificar se todos os poços mudam de cor (para



- amarelo), não ficando, adicionar um pouco mais de volume de tampão diretamente no poço);
29. Deixar no gelo;
  30. Guardar o Tampão de Neutralização;
  31. 17,8 $\mu$ L do Mix de Beads em cada poço (cuidar identificação das Beads (retirar o alumínio a fim de pegar o volume com a ponta da ponteira, diminuindo assim o volume de reagente que fica por fora da pipeta));
  32. Verificar se não faltou em nenhum poço e passar para a próxima Bead;
  33. Tampar;
  34. Agitar demoradamente no vortex (misturar bem);
  35. Pôr no termociclador a 60°C por 15MIN (com a borracha de vedação do termo);
  36. \* Preparar o Tampão da SAPE;
  37. Retirar da geladeira o tampão;
  38. O volume para uma placa é de 2376 $\mu$ L, isso é dividido em dois eppendorfs com 1188 $\mu$ L cada (para isso usa-se 2 vezes o volume de 594 $\mu$ L na pipeta, devido sua limitação de volume);
  39. Fechar e armazenar no escuro e à temperatura ambiente (na gaveta);
  40. \* Recongelar a placa com o produto amplificado;
  41. \* Colocar o Tampão de Lavagem no recipiente;
  42. Passados os 15 minutos, retirar a placa do termociclador;
  43. Rapidamente acrescentar 50 uL de Tampão de Lavagem em cada poço;
  44. Centrifugar por 5 minutos;
  45. Após o tempo, flicar de uma só vez na pia e deixar a placa virada sobre papel toalha;
  46. Repetir os passos 43 ao 45 por mais duas vezes;
  47. \*Durante a última centrifugada:
  48. Pegar o tampão da SAPE na gaveta;
  49. Passar a SAPE no vortex (devagar), deixar o ambiente o mais escuro o possível;
  50. Para 96 poços, passar um volume de 24uL de SAPE (divididos em dois tubos de Tampão de SAPE = 12 uL para cada)
  51. Misturar com a própria pipeta;
  52. Fechar os tubos e retorná-los para a gaveta;
  53. Flicar a placa que estava centrifugando;
  54. Homogeneizar a SAPE em vortex;
  55. Transferir o volume de 23,7uL de Tampão + SAPE para cada poço da placa;
  56. Verificar se todos os poços têm;
  57. Fechar placa e passar no vortex por aproximadamente 20 segundos;
  58. Pôr no termociclador à 60°C por 5 minutos;
  59. Ao sair do termociclador, acrescentar 50uL de Tampão de Lavagem;
  60. Centrifugar por 5 minutos;
  61. \* Desligar o termociclador;
  62. Flicar a placa;
  63. Colocar 50uL de Tampão de Lavagem;

64. Transferir para a placa do Luminex (de fundo em V);
65. Durante a transferência homogeneizar com a ponteira por pelo menos 20 vezes cada poço;
66. Pôr no aparelho para leitura;